

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTINA MAYUMI SASAKI MIYAZAKI

ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA ISOLADA DE *Pterocaulon lorentzii* Malme E *Pterocaulon alopecuroides* DC. COM ÊNFASE NA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

CURITIBA
2013

CRISTINA MAYUMI SASAKI MIYAZAKI

ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA ISOLADA DE *Pterocaulon lorentzii* Malme E *Pterocaulon alopecuroides* DC. COM ÊNFASE NA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS DE OVINOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA
2013

TERMO DE APROVAÇÃO

CRISTINA MAYUMI SASAKI MIYAZAKI

Título: ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro* da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina ISOLADA DE *Pterocaulon lorentzii* Malme E *Pterocaulon alopecuroides* D.C. COM ÊNFASE NA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA EM NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS DE OVINOS

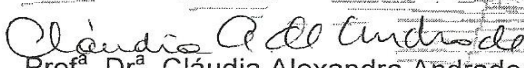
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

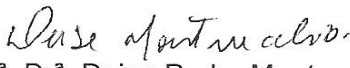

Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
(Orientador)


Prof.ª Dr.ª Eliane Carneiro Gomes
(Universidade Federal do Paraná)


Prof. Dr. Walfrido Kuhl Svoboda
(Universidade Federal do Paraná)


Prof.ª Dr.ª Silvana Krychak Furtado
(Universidade Tuiuti do Paraná)


Prof.ª Dr.ª Cláudia Alexandra Andrade
(Faculdades Integradas do Brasil)


Prof.ª Dr.ª Deise Prehs Montrucchio
(Universidade Federal do Paraná)

Curitiba, 06 de setembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Programa REUNI.

Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel pela orientação e ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel pela co-orientação, acompanhamento e revisão do trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento pelo apoio e orientação no desenvolvimento dos ensaios antiparasitários.

À Prof^a. Dr^a. Silvana Krychak Furtado da Universidade Tuiuti do Paraná pelo apoio nos ensaios antiparasitários.

Ao Prof. Dr. Rogério Luiz Kopp por ceder espaço em seu laboratório para a realização dos testes de eclodibilidade.

Ao curador do Museu Botânico de Curitiba, Osmar do Santos Ribas pelas informações, identificação e depósito dos exemplares das espécies em estudo.

Ao Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFPR.

À Central Analítica do Departamento de Farmácia da UFPR.

Ao Laboratório Paddock de Curitiba.

Aos Haras Anderson e Haras São Luis pelo fornecimento dos animais.

Ao funcionário da UFPR Paulo Sérgio Diniz pela contribuição com o desenvolvimento do trabalho.

Às Professoras Dr^a Josiane de Fátima Gaspari Dias e Dr^a Sandra Maria Warumby Zanin.

Às minhas amigas doutoras Cristina Peitz de Lima e Cláudia Alexandra Andrade.

Aos meus amigos doutorandas Beatriz Cristina Konopatzki Hirota, Maria Christina dos Santos Verdan, Milena Kalegari, Cristiane da Silva Paula, Cristiane Bezerra da Silva e Vinícius Bednarczuk de Oliveira.

Aos colegas dos laboratórios de Farmacotécnica e Fitoquímica do Departamento de Farmácia da UFPR.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de formas diversas contribuíram para este trabalho.

Aos colegas médicos veterinários do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFPR: Andressa Schafer, Fernando Kloster, Andréia Buzatti e Fernanda Fortes.

Ao colega e amigo Professor Arnielis Díaz Fernández da Universidad de Camaguey, Cuba.

À amiga e técnica do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFPR Úrsula Yaeko Yoshitani.

Aos médicos veterinários Dr. Jahir Alarcão Jr., Dr^a. Daniele Petterle e Dr^a. Regina Bürger Palma Rocha.

À médica veterinária sogra e amiga Dr^a. Helena Kyoko Abe pelo incansável apoio, otimismo e suporte técnico.

Aos colaboradores Zélio, Baiana e Pernambuco do Haras 41 do Jockey Clube de Curitiba pelo zelo e carinho diário com os animais.

À todos os amigos e colegas que de perto ou de longe permitiram que este trabalho fosse escrito.

Aos meus queridos familiares que fizeram das coletas de material vegetal um momento de união e alegria.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e incentivo.

Ao Key, meu marido, pelo incessante apoio, pelas longas horas de companheirismo, pela amizade sem igual e pelo carinho sem fim.

Ao meu filho, Ryu, luz da minha vida.

E à Deus, por me permitir fazer este trabalho.

Queremos ter certezas e não dúvidas,
resultados e não experiências, mas nem
mesmo percebemos que as certezas só
podem surgir das dúvidas e os resultados
somente através das experiências.

Carl Gustav Jung

RESUMO

Infecções gastrintestinais causadas por nematoides constituem um dos principais fatores limitantes para a ovinocultura no Brasil e em todo o mundo. A saúde dos rebanhos depende de um controle antiparasitário eficiente e a utilização de plantas medicinais como alternativa fitoterápica na medicina veterinária vêm ganhando espaço e se mostrando próspera. Tendo em vista os aspectos sociais, econômicos e ambientais este trabalho tem por objetivo estudar numa abordagem multidisciplinar a efetividade dos extratos, frações e da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina isolada das espécies *Pterocaulon alopecuroides* DC. e *Pterocaulon lorentzii* Malme. Como foco buscou-se a efetividade destas espécies em ensaios antiparasitários *in vitro* contra nematoides gastrintestinais de ovinos além dos seus potenciais antioxidantes e da toxicidade. As partes aéreas secas e estabilizadas de ambas espécies foram submetidas a extração com etanol e particionadas com solventes com gradiente de polaridade crescente hexano-clorofórmio-acetato de etila em aparelho de soxhlet modificado. A partir da cromatografia líquida em coluna da fração clorofórmio e elucidação estrutural por RMN ^1H e ^{13}C foi identificada a cumarina 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina. Os extratos brutos, as frações e a cumarina foram submetidos a bioensaios *in vitro* para avaliação de toxicidade, atividade antioxidante, e atividade anti-helmíntica. Na avaliação da ecotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* as amostras testadas apresentaram atividade apenas em concentrações superiores a 1000 $\mu\text{g/mL}$, consideradas não tóxicas neste ensaio. Da mesma forma, na avaliação da atividade hemolítica, tanto no teste em sangue de carneiro como em ágar sangue os extratos, as frações e a cumarina não apresentaram atividade. O potencial antioxidante foi avaliado por três metodologias. No teste de inibição do complexo fosfomolibdênio destacou-se a fração acetato de etila de *P. alopecuroides* que apresentou 36,4% de atividade em relação à vitamina C e 137,7% em relação à rutina. A fração acetato de etila de *P. lorentzii* também apresentou maior atividade em relação às demais amostras testadas ARR(%) de 101,7% em relação à vitamina C. No método de reação com o radical DPPH as frações acetato de etila de ambas espécies mostraram as melhores atividades, EC_{50} 10,74 $\mu\text{g/mL}$ para *P. alopecuroides* e EC_{50} 7,63 $\mu\text{g/mL}$ para *P. lorentzii*, em relação ao controle vitamina C (EC_{50} 2,48 $\mu\text{g/mL}$) e rutina (EC_{50} 9,43 $\mu\text{g/mL}$). As demais amostras, extrato bruto, fração hexano, fração clorofórmio e cumarina não apresentaram atividade significativa. No teste de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) as amostras mais expressivas foram os extratos brutos das duas espécies em relação ao controle positivo BHT cujo IA% $0,169 \pm 0,0087$. O extrato bruto de *P. alopecuroides* apresentou IA% $0,419 \pm 0,0517$ e o extrato bruto de *P. lorentzii* IA% $0,213 \pm 0,0094$. Já a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina apresentou IA% $0,462 \pm 0,0184$. Na avaliação da atividade anti-helmíntica pelo método da eclodibilidade de ovos de nematoides a cumarina apresentou atividade muito expressiva na inibição do desenvolvimento e eclosão dos ovos com EC_{50} 3,2 $\mu\text{g/mL}$, seguido das frações clorofórmio 17,2 $\mu\text{g/mL}$ (*P. alopecuroides*) e 9,4 $\mu\text{g/mL}$ (*P. lorentzii*) enquanto que as demais frações e extratos apresentaram atividades menores. Da mesma forma a cumarina apresentou maior atividade na inibição da migração de larvas de nematoides em ágar com EC_{50} 3,1 $\mu\text{g/mL}$ e as frações clorofórmio 104,1 $\mu\text{g/mL}$ (*P. alopecuroides*) e 64,7 $\mu\text{g/mL}$ (*P. lorentzii*). Os resultados obtidos sugerem a aplicação dos extratos e frações de *P. alopecuroides* e *P. lorentzii* e a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina no desenvolvimento de preparações farmacêuticas de uso veterinário.

Palavras-chave: *Pterocaulon*. Cumarina. Antioxidante. Anti-helmíntico. Nematoides.

ABSTRACT

Gastrointestinal infection caused by nematodes are the main limiting factor for sheep breeding in Brazil and around the world. Livestock healthiness depends on an efficient anthelmintic control and the use of medicinal plants as an herbal alternative in veterinary medicine is gaining space and showing prosperous. Considering the social, economic and environmental scope this work aims to study in a multidisciplinary approach, the effectiveness of extracts, fractions and 5-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyloxy)-6,7-methylenedioxycoumarin isolated from *Pterocaulon alopecuroides* DC. and *Pterocaulon lorentzii* Malme species. This study was focused on the effectiveness of these two species *in vitro* anthelmintic assays against sheep gastrointestinal nematodes as well as their antioxidant and toxicity potential. The dried and stabilized aerial parts of both species were subjected to extraction with ethanol and partitioned with solvents of increasing polarity gradient hexane-chloroform-ethyl acetate in modified soxhlet apparatus. From the liquid column chromatography of chloroform fraction an the structure elucidation by NMR ^1H and NMR ^{13}H the 5-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyloxy)-6,7-methylenedioxycoumarin was identified. The crude extracts, fractions and the coumarin were submitted to *in vitro* bioassays to evaluate toxicity, antioxidant activity, and anthelmintic activity. In the ecotoxicity assessment against *Artemia salina* tested samples showed activity only at concentrations over 1000 $\mu\text{g/mL}$ considered non-toxic in this assay. Likewise, in the hemolytic activity assay test in sheep blood and blood agar, extracts, fractions and the coumarin showed no activity. The scavenging activity was evaluated by three methods. In the phosphomolybdenum complex inhibition test the ethyl acetate fraction of *P. alopecuroides* showed 36.4% activity compared to vitamin C and 137.7% compared to rutin. The ethyl acetate fraction of *P. lorentzii* also showed higher activity in comparison to other samples tested with ARR (%) 101.7% compared to vitamin C. In DPPH reaction methods ethyl acetate fractions of both species showed the best activities, EC_{50} 10.74 mg/mL for *P. alopecuroides* and EC_{50} 7.63 mg/mL for *P. lorentzii* compared to the control Vitamin C (EC_{50} 2.48g/mL) and rutin (EC_{50} 9.43 g/mL). The remaining samples, crude extract, hexane fraction, chloroform fraction and the coumarin showed no significant activity. The crude extracts of the two species showed the most significant results in thiobarbituric acid reaction test (TBARS) in relation to the positive control BHT (AI $0.169 \pm 0.0087\%$). The crude extract of *P. alopecuroides* presented IA $0.419\% \pm 0.0517$ and the crude extract of *P. lorentzii* IA $0.213\% \pm 0.0094$. The 5-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyloxy)-6,7-methylenedioxycoumarin showed $0.462\% \pm 0.0184$. In the evaluation of anthelmintic activity by the egg hatch test (EHT) the coumarin showed very significant activity in inhibiting sheep nematoid egg development hatching with EC_{50} 3.2 mg/mL, followed by chloroform fractions 17.2 $\mu\text{g/mL}$ (*P. alopecuroides*) and 9.4 mg/mL (*P. lorentzii*) while the other fractions and extracts showed lower activity. As well as in the EHT the same coumarin showed higher effectiveness in inhibiting nematode larvae migration in agar with a EC_{50} 3.1 g/mL followed by the chloroform fractions 104.1g/mL (*P. alopecuroides*) and 64.7 mg/mL (*P. lorentzii*). The obtained results suggest the application of extracts and fractions of *P. alopecuroides* and *P. lorentzii* and 5-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyloxy)-6,7-methylenedioxycoumarin in the development of pharmaceutical preparations for veterinary use.

Keywords: *Pterocaulon*. Coumarin. Antioxidant. Anthelmintic. Nematoids.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO <i>Pterocaulon</i>	23
FIGURA 2 -	<i>Pterocaulon balanseae</i> Chodat.....	24
FIGURA 3 -	PARTES AÉREAS DE <i>Pterocaulon alopecuroides</i> DC.	26
FIGURA 4 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS (1), (2), (3), (4) E (5) IDENTIFICADOS POR STEIN <i>et al.</i> (2006).....	27
FIGURA 5 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS (1), (2), (3), (4), (5) E (6) IDENTIFICADOS POR Alarcón <i>et al.</i> , (2010).....	28
FIGURA 6 -	PARTES AÉREAS DE <i>Pterocaulon lorentzii</i> Malme.....	29
FIGURA 7 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTOLOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA.....	31
FIGURA 8 -	NAUPLIOS DE <i>Artemia salina</i>	32
FIGURA 9 -	ATIVIDADE SEQÜESTRADORA DO RADICAL LIVRE 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA - DPPH•.....	34
FIGURA 10 -	CICLO DE VIDA DE TRICOSTRONGILÍDEOS.....	37
FIGURA 11 -	OVO BLASTOMERADO E LARVA DE <i>Haemonchus contortus</i> ..	39
FIGURA 12 -	FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, DAS FRAÇÕES E DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTOLOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA.....	43
FIGURA 13 -	SOXHLET FARMACOTÉCNICO MODIFICADO.....	43
FIGURA 14 -	SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO.....	44
FIGURA 15 -	APARATO PARA O TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR (MODIFICADO).....	58
FIGURA 16 -	EXTRAÇÃO E PARTIÇÃO EM APARELHO DE SOXHLET MODIFICADO.....	60
FIGURA 17 -	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTOLOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA	62
FIGURA 18 -	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTOLOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA EXPANDIDO DE δ1-8ppm (A) E δ6-8ppm (B).....	63
FIGURA 19 -	ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTOLOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA	65

FIGURA 20 - DEPT DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA 5-(2,3-DIHI-DROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA	66
FIGURA 21 - PLACAS DE ÁGAR SANGUE DOS CONTROLES: POSITIVO TRITON 2% (A) E NEGATIVOS METANOL (B) E SALINA 0,9% (C).....	69
FIGURA 22 - PLACAS DE ÁGAR SANGUE COM AMOSTRAS DE <i>P. alopecuroides</i>	70
FIGURA 23 - PLACAS DE ÁGAR SANGUE COM AMOSTRAS DE <i>P. lorentzii</i> Malme.....	71
FIGURA 24 - PLACAS DE ÁGAR SANGUE COM 5-(2,3-DIHI-DROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA.....	72
FIGURA 25 - CCD ILUSTRATIVA DE DPPH QUALITATIVO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>P. alopecuroides</i> E <i>P. lorentzii</i> , DA 5-(2,3-DIHI-DROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA E DO PADRÃO RUTINA.....	76

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	TAXA DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO À VITAMINA C DAS AMOSTRAS DE <i>P. alopecuroides</i> DC.	73
GRÁFICO 2 -	TAXA DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO À RUTINA DAS AMOSTRAS DE <i>P. alopecuroides</i> DC.	73
GRÁFICO 3 -	TAXA DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO AOS CONTROLES VITAMINA C E RUTINA DAS AMOSTRAS DE <i>P. lorentzii</i> Malme.....	74
GRÁFICO 4 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA VITAMINA C.....	77
GRÁFICO 5 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA RUTINA.....	77
GRÁFICO 6 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>P. alopecuroides</i>	78
GRÁFICO 7 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO CLOOFÓRMIO DE <i>P. alopecuroides</i>	78
GRÁFICO 8 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>P. alopecuroides</i>	78
GRÁFICO 9 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>P. lorentzii</i>	79
GRÁFICO 10 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DE <i>P. lorentzii</i>	79
GRÁFICO 11 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>P. lorentzii</i>	79
GRÁFICO 12 -	EFICÁCIA DAS AMOSTRAS DE <i>P. alopecuroides</i> DC. NA ECLODIBILIDADE DE OVOS DE NEMATÓIDES DE OVINOS....	84
GRÁFICO 13 -	EFICÁCIA DAS AMOSTRAS DE <i>P. lorentzii</i> Malme NA ECLODIBILIDADE DE OVOS DE NEMATÓIDES DE OVINOS....	85

GRÁFICO 14 -	EFICÁCIA DA CUMARINA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA NA ECLODIBILIDADE DE OVOS DE NEMATÓIDES DE OVINOS....	85
GRÁFICO 15 -	EFICÁCIA DAS AMOSTRAS DE <i>P. alopecuroides</i> DC. NA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE NEMATOIDES DE OVINOS EM ÁGAR.....	87
GRÁFICO 16 -	EFICÁCIA DAS AMOSTRAS DE <i>P. lorentzii</i> Malme NA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE NEMATOIDES DE OVINOS EM ÁGAR.....	88
GRÁFICO 17 -	EFICÁCIA DO CONTROLE POSITIVO IVERMECTINA NA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE NEMATOIDES DE OVINOS EM ÁGAR.....	88
GRÁFICO 18 -	EFICÁCIA DA CUMARINA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA NA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE NEMATOIDES DE OVINOS EM ÁGAR.....	89

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	RELAÇÃO DE DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS PARA TESTE	
	PRELIMINAR.....	48
QUADRO 2 -	OBSERVAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE HEMÓLISE NO TESTE	
	PRELIMINAR.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ¹³ C DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA OBTIDOS COM A LITERATURA.....	64
TABELA 2 -	MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> E ESTIMATIVA DE LC50.....	67
TABELA 3 -	RESULTADO DE EC ₅₀ E TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH DAS AMOSTRAS DE <i>P. alopecuroides</i> E <i>P. lorentzii</i>	80
TABELA 4 -	RESULTADO DA CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO O TESTE DE TUKEY PARA A REAÇÃO AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO DAS AMOSTRAS DE <i>P. alopecuroides</i> E <i>P. lorentzii</i>	82
TABELA 5	RESULTADO DE EC ₅₀ PARA INIBIÇÃO DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR DAS AMOSTRAS DE <i>P. alopecuroides</i> E <i>P. lorentzii</i>	89

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA%	Porcentagem de Atividade Antioxidante
AAR%	Porcentagem de Atividade Antioxidante Relativa
AchE	Enzima Acetilcolinesterase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrofotômetro de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
D.C.	De Candolle
DPPH	2,2 difenil-1-picril-hidrazil
EB	Extrato Bruto
EC ₅₀	Concentração Efetiva Média
FA	Fração Acetato de Etila
FC	Fração Clorofórmica
FH	Fração Hexânica
g	Grama
GL	Gay-Lussak
°C	Grau Celsius
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IV	Infravermelho
L ₁	Larva em 1º estágio de desenvolvimento
LC ₅₀	Concentração média letal
M	Mol
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mmHg	Milímetros de Mercúrio
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
NEU	Reativo 2-aminoetilbutirato
nm	Nanômetros
OPG	Ovos por grama
P A	Para Análise
ppm	Parte por milhão
pH	Potencial Hidrogeniônico
%	Porcentagem
RNM ¹ H	Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio
RNM ¹³ C	Ressonância Nuclear Magnética de Carbono 13
TAS	Teste de <i>Artemia salina</i>
TBARS	Thiobarbituric acid reaction
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ASTERACEAE	22
3.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>Pterocaulon</i>	22
3.3 AS ESPÉCIES <i>Pterocaulon lorentzii</i> Malme E <i>Pterocaulon alopecuroides</i> DC.	25
3.3.1 <i>Pterocaulon alopecuroides</i> DC.	24
3.3.2 <i>Pterocaulon lorentzii</i> Malme	28
3.3.3 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina	30
3.4 TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	31
3.5 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	32
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	33
3.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE PARASITISMO POR NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS EM PEQUENOS RUMINANTES	35
3.7.1 Família Trichostrongylidae	37
3.7.2 Hemoncose	38
3.7.3 Plantas com atividade anti-helmíntica	39
3.7.4 Avaliação da atividade nematicida	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 MATERIAL VEGETAL	42
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	42
4.2.1 Obtenção dos extratos	43
4.2.2 Obtenção das frações	44
4.2.3 Obtenção das substâncias isoladas	44
4.2.3.1 Cromatografia líquida em coluna	44
4.2.3.2 Elucidação estrutural	45
4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	45
4.3.1 Preparo da solução salina	45
4.3.2 Eclosão dos ovos	46
4.3.3 Preparo das amostras	46

4.3.4 Avaliação da toxicidade.....	46
4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA <i>in vitro</i>	47
4.4.1 Atividade hemolítica em sangue de carneiro	47
4.4.2 Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue	48
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	49
4.5.1 Formação do complexo fosfomolibdênico.....	49
4.5.2 Avaliação da capacidade de reação com 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)...	50
4.5.2.1 Construção da curva de calibração do DPPH.....	51
4.5.3. Teste de atividade antioxidante pelo método de reação ao ácido tiobarbitúrico (modificado).....	51
4.6 EFICÁCIA DOS EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>P.</i> <i>alopecuroides</i> E <i>P. lorentzii</i> NA INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS OVOS DE NEMATÓIDES DE OVINOS.....	53
4.6.1 Teste de eclodibilidade de ovos de nematoides <i>in vitro</i>	53
4.6.1.1 Triagem do animal e avaliação da carga parasitária.....	53
4.6.1.2 Obtenção de ovos de nematoides de ovinos.....	54
4.6.1.3 Teste da eclodibilidade de ovos (TEO).....	55
4.6.2 Teste de migração de larva em ágar (Modificado).....	56
4.6.2.1 Triagem do animal e avaliação da carga parasitária.....	56
4.6.2.2 Obtenção de larvas (L ₃) de nematoides de ovinos.....	56
4.6.2.3 Teste de migração de larvas em ágar (TMLA).....	57
5 RESULTADOS	59
5.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA.....	59
5.1.1 Obtenção dos extratos e frações.....	59
5.1.2 Isolamento das substâncias	60
5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	67
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA	68
5.3.1 Atividade hemolítica em sangue de carneiro	68
5.3.2 Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue	69
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	73
5.4.1 Formação do complexo fosfomolibdênico	73
5.4.2 Redução do radical DPPH.....	76
5.4.2.1 DPPH Qualitativo.....	76
5.4.2.2 DPPH Quantitativo.....	77

5.4.3 Teste de atividade antioxidante pelo método de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	81
5.5 EFICÁCIA DOS EXTRATOS, SUAS FRAÇÕES E CUMARINA ISOLADA DE <i>P. alopecuroides</i> E <i>P. lorentzii</i> NA INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS OVOS DE NEMATÓIDES DE OVINOS E NO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR	83
5.5.1 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)	84
5.5.2 Teste de migração larval em ágar (TMLA).....	87
6. CONCLUSÃO	92
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
REFERÊNCIAS	95
GLOSSÁRIO	109
ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO

A grandeza da flora brasileira e de sua biodiversidade não está contida apenas na extensão de sua floresta equatorial e tropical úmida, mas principalmente no conhecimento sobre plantas medicinais. Sabedoria esta que representa para muitas comunidades e grupos étnicos o único recurso terapêutico para o tratamento e cura de enfermidades (HOSTETTMANN *et al.*, 2008). Nas regiões mais pobres do país assim como em grandes cidades, ainda hoje, plantas medicinais nativas e cultivadas são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em hortas domésticas (MACIEL *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2002).

Cerca de 80% da população mundial faz uso da medicina tradicional para a atenção básica à saúde (MURAD *et al.*, 2011). A população da Ásia, África e América Latina faz uso da medicina tradicional não só pela acessibilidade, mas também por fazer parte de um sistema de crença, e ser considerado necessário para o seu dia-a-dia e seu bem estar. Enquanto isso, na Austrália, Europa e América do Norte esta prática vem sendo usada cada vez mais em paralelo com a medicina alopática, particularmente para tratar doenças crônicas além de ser usado devido às preocupações com os efeitos colaterais de medicamentos químicos e o desejo de ter um tratamento mais personalizado (WHO, 2002).

É necessário observar que o uso para diversos propósitos e o aumento na demanda por plantas têm resultado numa super exploração e colheita excessiva de plantas medicinais (MURAD *et al.*, 2011).

A química de produtos naturais no Brasil é considerada dentro da química brasileira a área mais antiga e a que ainda impulsiona a pesquisa científica de plantas medicinais para a obtenção de novos fármacos (PINTO *et al.*, 2002). Esta cultura medicinal popular contribui para o estudo multidisciplinar envolvendo a botânica, farmacologia e fitoquímica principalmente. Esta teve como maior contribuição a orientação dos estudos para a determinação de novas estruturas dos metabólitos secundários e suas possíveis funções nas plantas, esclarecendo os mecanismos de biossíntese e desenvolvendo a quimiotaxonomia (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Os compostos oriundos de fontes vegetais estruturalmente definidos são facilmente identificados a partir de seus extratos por métodos de análise detalhada e precisa, conhecido como *screening* fitoquímico. Alguns métodos exigem determinado grau de pureza dos compostos ou preparo prévio das amostras (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Aplicada ao estudo de plantas medicinais, a etnobotânica que se ocupa de estudo e conceituações desenvolvidas por uma determinada sociedade a respeito do mundo vegetal, tem uma relação estreita com a etnofarmacologia, responsável pela exploração científica de agentes biologicamente ativos tradicionalmente empregados ou observados por determinado grupo de pessoas (MACIEL *et al.*, 2002).

Os produtos naturais continuam sendo importantes na química medicinal por serem fonte de protótipos e de possíveis fármacos uma vez que moléculas com complexidade estrutural podem estar presentes nos produtos naturais com possíveis mecanismos de ação sobre alvos moleculares relacionados a patologias. As características estruturais dos produtos naturais podem ser usadas como elementos parciais a partir dos quais se pode construir um repertório de combinações, como é caso das estatinas, fundamentais no tratamento das hiperlipidemias; modelos para a construção de uma série de inibidores das proteases do HIV; e ainda, a ocorrência de sinergismo que ocorre em extratos vegetais entre os compostos individuais de uma ou de várias plantas que são parte importante do seu efeito terapêutico (YUNES; CECHINEL FILHO, 2009).

A química de produtos naturais assim, assume uma abrangência interessante às várias atividades ligadas à pecuária, à agricultura e à produção de fitofármacos focando não apenas a lucratividade mas principalmente a viabilidade ecológica e preservação do ecossistema diminuindo o uso de produtos químicos convencionais.

Neste sentido, este trabalho abordou a avaliação das atividades tóxicas, hemolíticas, antioxidantes e anti-helmínticas dos extratos e das frações de *Pterocaulon alopecuroides* DC. e *Pterocaulon lorentzii* Malme assim como da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina isolada destas espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar, numa abordagem multidisciplinar, a efetividade dos extratos, das suas frações e da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina isolada das espécies *Pterocaulon alopecuroides* DC. e *Pterocaulon lorentzii* Malme frente a bioensaios específicos buscando seu potencial farmacológico com ênfase na atividade antiparasitária.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina dos extratos e frações de *Pterocaulon alopecuroides* DC. e *Pterocaulon lorentzii* Malme por métodos cromatográficos e espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
- Avaliar a toxicidade dos extratos e da substância isolada de *Pterocaulon alopecuroides* DC. e *Pterocaulon lorentzii* Malme frente à *Artemia salina*.
- Avaliar a toxicidade dos extratos e da substância isolada pelo teste de hemólise;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos, das frações e da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina.
- Avaliar a eficácia dos extratos, das frações e da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina na inibição do desenvolvimento *in vitro* dos ovos de nematoides de ovinos e no teste *in vitro* de migração de larvas de nematoides de ovinos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ASTERACEAE

As espécies da família Asteraceae são conhecidas por produzirem poliacetilenos, óleos essenciais e terpenos, sendo que a larga ocorrência de lactonas sesquiterpênicas é a característica quimiotaxonômica da família. Na literatura são observados estudos que evidenciam as atividades antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica, anti-inflamatória e antipirética. Muitas dessas espécies são conhecidas por causarem dermatite, enquanto outras inibem a penetração da cercária de *Schistosoma mansoni* (STEFANELLO, 1993).

3.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE O GÊNERO *Pterocaulon*

Com base em caracteres vegetativos e reprodutivos, além de caracteres químicos, palinológicos e citológicos (LIMA; MATZENBACHER, 2008), o gênero *Pterocaulon* está classificado como pertencente à família Asteraceae, subfamília Asteroideae e à tribo Plucheeae, criada a partir do desmembramento da tribo Inuleae (ANDREBERG, 1989).

De acordo com a primeira revisão realizada por Cabrera e Ragonesi em 1978, o gênero *Pterocaulon* é constituído por 18 espécies, das quais 12 encontram-se distribuídas no continente americano. Registra-se a ocorrência destas desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina. E seis são australianas alcançando a Nova Caledônia, Indonésia e sudeste da Ásia, sendo estas pouco exploradas quimicamente até o momento. (FIGURA 1).

Nos estados do sul do Brasil são listados por Lima (2006) 10 espécies do gênero *Pterocaulon* conforme relatado na literatura, dentre eles: *P. alopecuroides* (RAMBO, 1952; CABRERA, 1974; CABRERA e RAGONESE, 1978; CABRERA e FREIRE, 1998); *P. angustifolium*, *P. balansae* e *P. polystachium* (MALME, 1931; RAMBO, 1952; CABRERA, 1974; CABRERA e

RAGONESE, 1978; CABRERA e FREIRE, 1998); *P. cordobense* (MALME, 1931; RAMBO, 1952; CABRERA e RAGONESE, 1978; CABRERA e FREIRE, 1998); *P. lorentzii* (MALME, 1931; RAMBO, 1952; CABRERA, 1974; CABRERA e RAGONESE, 1978; SEELINGER, 1992; CABRERA e FREIRE, 1998); *P. polypterum* (MALME, 1931; RAMBO, 1952; CABRERA e RAGONESE, 1978); *P. purpurascens* (RAMBO, 1952; SEELINGER, 1992); *P. rugosum* (RAMBO, 1952; CABRERA, 1974; CABRERA e RAGONESE, 1978; CABRERA e FREIRE, 1998); *P. virgatum* (RAMBO, 1952; CABRERA e RAGONESE, 1978; CABRERA e FREIRE, 1998).

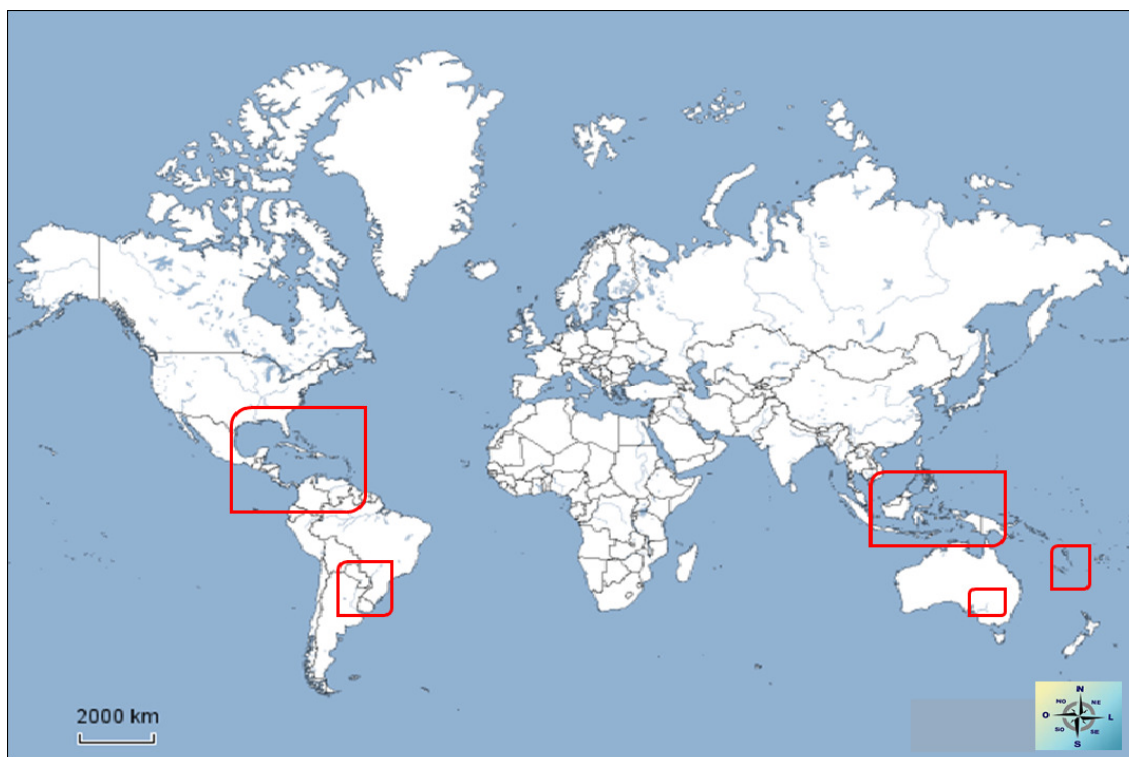


FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO *Pterocaulon*

FONTE: Disponível em: http://www.santiago.pro.br/mapas/mundo/mundo_mudo_carto.JPG. Modificado pelo autor (2013)

Espécies do gênero *Pterocaulon* são utilizadas na medicina tradicional em diferentes partes do mundo pelas suas propriedades antibióticas (flavonoides e sesquiterpenos) (MACLEOD e RASMUSSEN, 1999), antiviral (flavonoides) (SEMPLE *et al.*, 1998 e 1999), citotóxicas (extrato diclorometano) (MONGELLI *et al.*, 2000), antifúngicas (cumarinas) (STEIN *et al.*, 2005) e amebicida (extratos apolares) (RÓDIO *et al.*, 2008).

Vera *et al.* (2001) relatou que as cumarinas são as principais constituintes dos extratos lipofílicos das espécies de *Pterocaulon* investigadas até o momento.

Extratos de espécies do gênero *Pterocaulon* [*P. alopecuroides* e *P. balanseae* (FIGURA 2)] possuem amplo espectro de atividade contra fungos patogênicos oportunistas responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas e dermatológicas, justificando o uso destas plantas no tratamento de doenças de pele de animais popularmente diagnosticadas como micoses. A principal atividade antifúngica foi atribuída aos extratos hexano e clorofórmio (STEIN, 2005). Num estudo posterior, Stein (2006) mostrou que a atividade antifúngica se deve principalmente pela presença de cumarinas preniletina e preniletina-metil-éter.



FIGURA 2 – *Pterocaulon balanseae* Chodat

FONTE: Disponível em: www.ib.unicamp.br/.../familias/Asteraceae.html Acesso em: 20 de abril de 2009

Em estudo etnobotânico, Debenedetti *et al.* (1992) relata o uso tradicional das partes aéreas de *P. purpurascens* e *P. virgatum* na Argentina

pelas suas propriedades digestivas, emenagogas, inseticidas e como agente contra picada de cobras. Em 1994, esta mesma equipe de pesquisa relata o uso de *P. polystachium* como repelente de pulgas e moscas assim como o uso em casos de insolação.

Em testes *in vivo* em ovinos usando extrato bruto de *Pterocaulon interruptum* Krychak-Furtado (2006) obteve, administrando 33,34 mg/kg de peso corporal via oral, redução de 47% na contagem de ovos de trichostrongilídeos eliminados nas fezes.

3.3 Espécies *Pterocaulon lorentzii* Malme e *Pterocaulon alopecuroides* DC.

3.3.1 *Pterocaulon alopecuroides* DC.

Até recentemente uma das espécies em estudo era denominada como *Pterocaulon interruptum* DC. Entretanto, no último depósito de material vegetal junto ao Museu Botânico Municipal de Curitiba, obteve-se a orientação de que a referida denominação é considerada sinônimo da espécie *Pterocaulon alopecuroides* DC. Portanto, a partir da confirmação desta informação recebida pelo Mestre em Taxonomia Vegetal e doutorando em Biologia Vegetal na Unicamp, Marcelo Monge, passamos a denominar a espécie em estudo como *Pterocaulon alopecuroides* DC. (FIGURA 3).

Esta espécie caracteriza-se por ser planta perene com altura entre 1 e 1,5m, caules eretos, sensíveis, penta-alados, lanosos e folhosos. As folhas são alternas, sésseis e decorrentes, sendo as inferiores obovado-lanceoladas, obtusas no ápice e semi-inteiras ou ligeiramente dentadas na margem de 10 a 15 cm de comprimento e 2,5 a 4 cm de largura. As superiores são lanceoladas, agudas, levemente denticulada a dentada na margem, variando o comprimento entre 8 e 10 cm e a largura entre 1,5 e 3 cm. Capítulos numerosos, sésseis, dispostos em espigas, involúcro acampanado, brácteas exteriores lanceoladas lanosas. Flores dimorfas, sendo as marginais numerosas e femininas, com corola filiforme de 4 mm de largura e dentada no ápice, e as flores do disco

hermafroditas ou masculinas, de 3 a 5, com corola tubulosa, pentadentada no limbo e aquênios pubescente-glandulosos (CABRERA, 1963).

Estudos fitoquímicos realizados anteriormente demonstraram a presença de quatro cumarinas isoladas de espécies do gênero *Pterocaulon* entre elas o *P. alopecuroides* DC. que demonstrou atividade antifúngica (STEIN *et al.*, 2006 e 2007), um dihidroflavonol (VILEGAS *et al.*, 1995) e outros seis flavonóides com atividade antibacteriana (ALARCÓN *et al.*, 2008).



FIGURA 3 – PARTES AÉREAS DE *Pterocaulon alopecuroides* DC.

FONTE: O autor, 2009.

NOTA: Fotos tiradas no município de CURITIBA/PR (25°23'38.9"S 49°16'12"W)

O trabalho desenvolvido por Stein (2006) e colaboradores destacou a identificação de quatro cumarinas isoladas da fração hexânica das partes aéreas de *P. alopecuroides* DC., *Pterocaulon balansae* e *Pterocaulon polystachyum* sendo elas as seguintes: 5-metoxi-6,7-metilenedioxycumarina (1) isolado de *P. balansae*, 5-metoxi-6,7-metilenedioxycumarina (1) e 7-(2',3'-epoxi-3'-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (2) isolados de *P. alopecuroides*, e 5-metoxi-6,7-metilenedioxycumarina (1), 6,7-metilenedioxycumarina (ayapin) (3), uma mistura de 6-hidroxi-7-(3'-metilbutil-2'-en-oxi)-cumarina (preniletina) (4) e 6-metoxi-7-(3'-metilbutil-2'-en-oxi)-cumarina (preniletina-metil-éter) (5) isolados

de *P. polystachium* (FIGURA 4). Neste trabalho, os compostos (4) e (5) isolados de *P. polystachyum* apresentaram atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e os dermatófitos *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Os compostos (1), (2) e (3) foram isolados tanto de *P. alopecuroides* como de *P. polystachyum* e não apresentaram atividade significativa no ensaio.

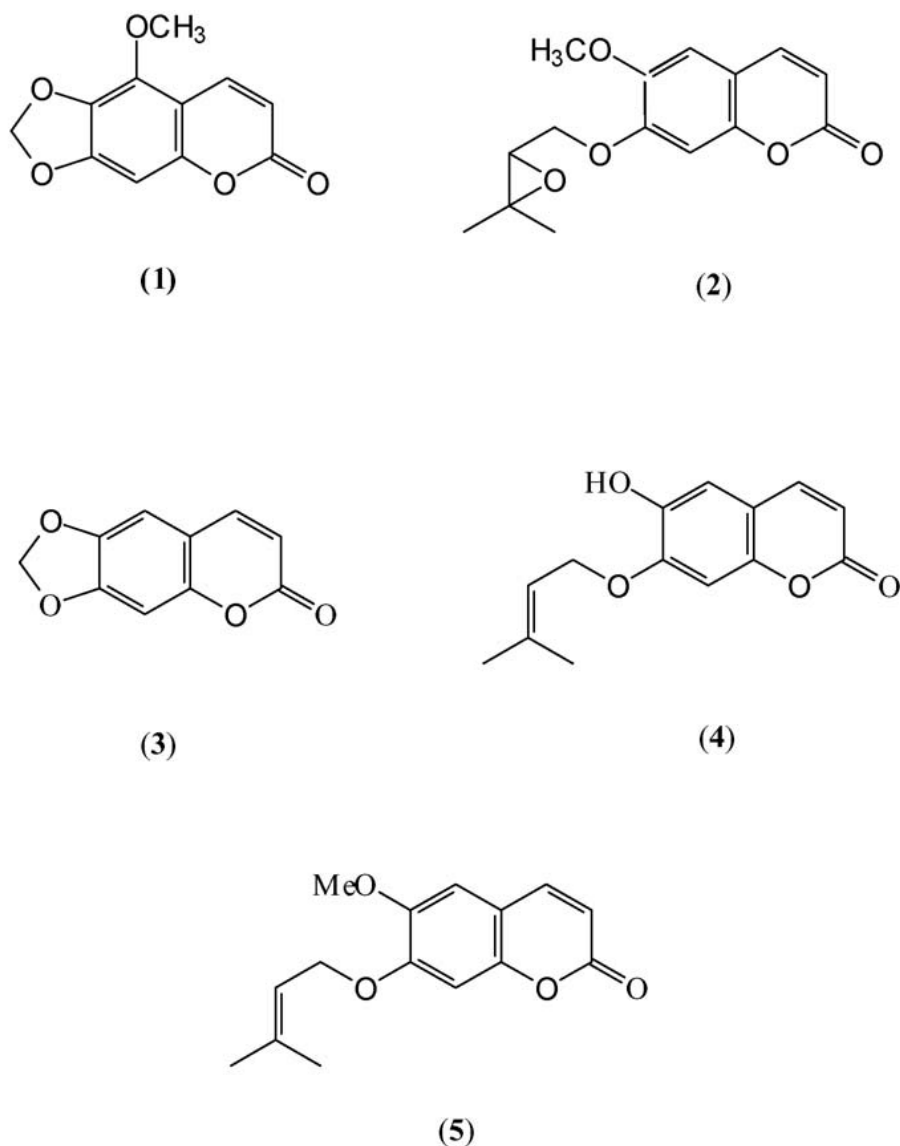


FIGURA 4 - – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS (1), (2), (3), (4) E (5) IDENTIFICADOS POR STEIN *et al.* (2006)
Fonte: STEIN *et al.*, 2006.

Estudo realizado em 2008 na Argentina por Alarcón *et al.*, reportou seis compostos isolados de *P. alopecuroides* DC. sendo eles: três novos

flavonoides (2S)-5,4-dihidroxi-7-(2-hidroxi-3-metil-3-buteniloxi) flavanona (1), (2R, 3R)-5,4-dihidroxi-7-(2-hidroxi-3-metil-3-buteniloxi) dihidroflavonol (2), 5,3,4-trihidroxi-7-(γ , γ -dimetilaliloxi) flavonol (3), uma nova cumarina 7-(2,2,5,5-tetrametil-1,3-dioxolan-4-il) metoxi-6-metoxicumarina (4) e os compostos já conhecidos dihidrocampferol (5) e 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxi)-6-metoxicumarina (6) todos mostrados na Figura 5.

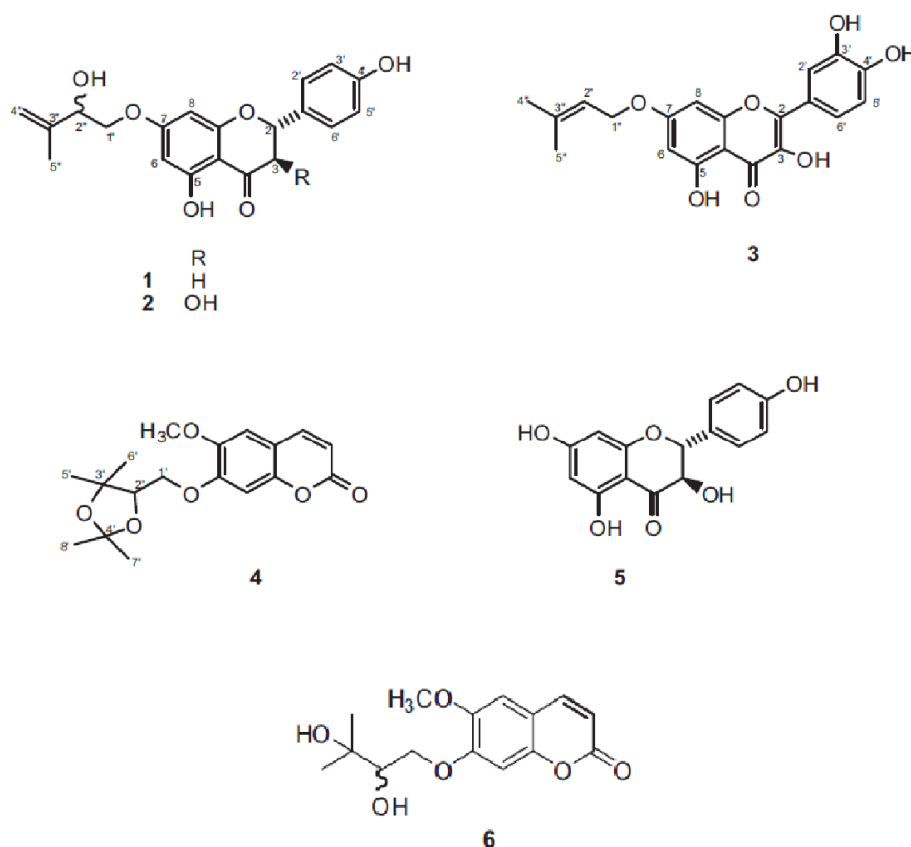


FIGURA 5 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS (1), (2), (3), (4), (5) E (6) IDENTIFICADOS POR ALARCÓN (2010)
FONTE: ALARCÓN *et al.*, 2010

3.3.2 *Pterocaulon lorentzii* Malme

Pterocaulon lorentzii Malme (FIGURA 6), subarbusto, ereto ou ascendente variando entre 29,5 a 86,0 cm de altura, com xilopódio desenvolvido do qual partem numerosas raízes delgadas e ramos ascendentes. Apresenta caule simples com raras ramificações no ápice, albo-

tomentoso em toda extensão, penta-alado, discolor e rugoso com 1 a 4 mm de largura. As folhas basais são lanceoladas a oblongo-lanceoladas de 4 a 10 cm de comprimento e 0,7 a 2 cm de largura, discolores, brilhantes no epifilo com face adaxial glabra ou lanosa, e abaxial albo-tomentosa, levemente denticulada a dentada na margem, ápice agudo a subobtusos, base atenuada. Folhas apicais lanceoladas a lineares com 4 a 9,5 cm de comprimento e 0,1 a 1,5 cm de largura, discolores, brilhantes no epifil, com face adaxial glabra, às vezes esparsamente lanosa e a face abaxial albo-tomentosa, inteira a levemente denticuladas na margem, ápice agudo ou subagudo. Capítulos dispostos em espiga de glomérulos, apical, com glomérulos espaçados na base e congestos no ápice da ráquis. Capítulos heteromorfos, brácteas involucrais paucisseriadas. Flores pistiladas numerosas, filiformes, radiais, 3-dentadas no ápice, esbranquiçadas sem tricomas glandulosos, flores do disco estaminadas, esbranquiçadas e tubulosas (LIMA; MATZENBACHER, 2008).

Ocorre preferencialmente em solos arenosos, e por isso é facilmente encontrado no litoral sendo facilmente visualizado durante sua floração. Diferencia-se das demais espécies do gênero principalmente pelas lâminas foliares, brilhantes na face adaxial e revolutas na margem (LIMA; MATZENBACHER, 2008).

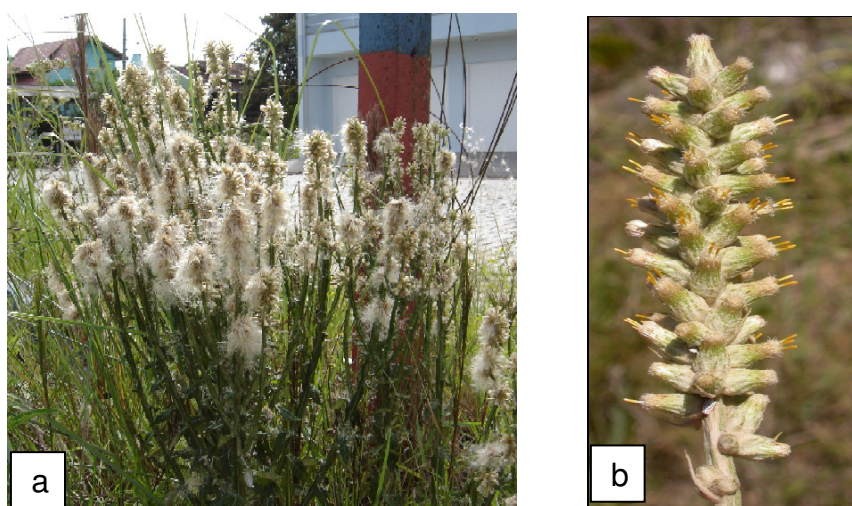


FIGURA 6 – PARTES AÉREAS DE *Pterocaulon lorentzii* Malme

FONTE: a – MIGUEL (2006) e b – Disponível em :

www.diversityoflife.org/taxpage/0/0/79/binomi. Acesso em 20 de abril de 2009.

NOTA: a foto (a) foi tirada no município de Piçarras / SC (26°46'09.2"S 48°40'05"W)

A espécie apresenta significativa concentração de alguns compostos químicos de grande interesse farmacológico e industrial como é o caso da cumarina 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina, triterpenos 3-o-acetil-pseudotaraxasterol, pseudotaraxasterol e taraxasterol e o flavonóide quercetina, isolados a partir das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila (SASAKI, 2008).

O estudo das atividades biológicas das espécies *Pterocaulon alopecuroides* e *Pterocaulon lorentzii*, aliado a estudos agrônômicos pode contribuir com informações científicas capazes de mover a pesquisa agrônômica para fins de cultivo das espécies em propriedades rurais com a finalidade de ser usado como agente de controle integrado de endo e ectoparasitas permitindo assim a redução do uso de medicamentos sintéticos. Além disso, por se tratar de uma espécie sazonal da própria flora brasileira, pode ser cultivada entre as pastagens ou ser usada como alternativa de cultura entressafra.

3.3.3 5-(2,3-DIHDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA

A 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina foi inicialmente identificada por Debenedetti *et al.* (1981) e denominada Sabandinol. Em 1997, com um trabalho de revisão estrutural desta e de outras cumarinas, foi estabelecida sua denominação química como 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina (DEBENEDETTI *et al.*, 1997) (FIGURA 7).

A consulta nas bases de dados ISI Web of Knowledge, Scirus e Medline no período de março de 2009 a setembro de 2013, não identificou estudos biológicos envolvendo a referida substância foco deste trabalho. Entretanto, estudos realizados recentemente relataram o isolamento e identificação desta cumarina por Sasaki a partir da fração clorofórmio de *P. lorentzii* Malme (2008) e por Heemann *et al.* (2006) de *P. alopecuroides* DC., o que motivou a realização deste trabalho.

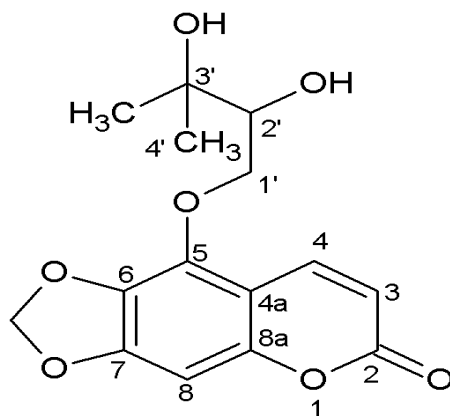


FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA

Fonte: HIROTA (2013), desenho em programa ACDChem para Windows®.

3.4 TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* (TAS) é um ensaio biológico rápido, de baixo custo que não requer ambiente asséptico proposto por MICHAEL, THOMPSON e ABRAMOVITZ (1956) e modificado em 1982 por MEYER e colaboradores. Utiliza um número considerável de indivíduos para validação estatística. A amostra utilizada é relativamente pequena (2-20 mg) e não requer equipamentos especiais (MCLAUGHLIN, CHANG E SMITH, 1991).

O uso de peixes e invertebrados aquáticos na avaliação da toxicidade de compostos torna-se interessante por serem sensíveis às variações dos parâmetros ambientais. A *Artemia* sp. é cosmopolita e distribuída em todas as regiões do mundo, adapta-se facilmente aos mais diversos ambientes devido a sua relativa resistência a fatores ambientais como variações de salinidade, concentração de oxigênio e temperatura. Por isso é o organismo utilizado para avaliação de ecotoxicidade de produtos como pesticidas, petroquímicos, metais pesados, derivados carcinogênicos e metabólitos de microrganismos (BEVILACQUA, 2008).

Artemia salina (FIGURA 8) é um micro crustáceo marinho utilizado como alimento vivo para peixes e pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal (LC₅₀) (MEYER *et al.*, 1982). Este ensaio é usado para estudo biológico inicial de um grande número de amostras para detecção

simultânea de toxicidade e fototoxicidade (OJALA *et al.*, 1999; MOREIRA *et al.*, 2003; PIMENTA *et al.*, 2003).

Por meio deste bioensaio correlaciona-se a toxicidade sobre *A. salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida (MACRAE *et al.*, 1988; CÁCERES *et al.*, 1998; CHAN-BACAB *et al.*, 2003), e tem sido citado em avaliações precursoras de extratos de plantas com possível atividade antitumoral (RUPPRECHT *et al.*, 1990; SIQUEIRA *et al.*, 2001).



FIGURA 8 – NAUPLIOS DE *Artemia salina*

FONTE: Disponível em: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/79674/4625/Brine-shrimp> Acesso em: 18 de agosto de 2009.

3.5. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Diversas técnicas são empregadas na avaliação da atividade hemolítica, podendo ser avaliações de atividade por via direta, consistindo na dissolução de eritrócitos, membranas celulares, aumento da permeabilidade de membranas e lise celular. Estes métodos avaliam basicamente a ruptura de membrana e a morte celular ou seja, consistem na verificação de possíveis danos de substâncias presentes nos extratos sobre as células do sistema hematopoiético em especial os eritrócitos que quando lisados liberam hemoglobina ao meio.

Faz-se necessário avaliar a atividade hemolítica dos extratos vegetais dada as várias atividades que um extrato ou seus metabólitos secundários isolados podem apresentar, a atividade hemolítica pode ser considerada um parâmetro de citotoxicidade importante que somado a outros critérios de toxicidade podem respaldar a avaliação de segurança do uso de determinada espécie vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A formação de espécies reativas de oxigênio vêm sendo associada à deterioração oxidativa de alimentos, bem como na patogênese de diversas doenças tais como aterosclerose, diabetes *mellitus*, inflamações crônicas, doenças neurodegenerativas e certos tipos de câncer. Os efeitos putativos de substâncias antioxidantes contra estas reações deletérias têm recebido atenção crescente nos últimos tempos em especial no âmbito biológico, farmacêutico, médico, nutricional e agrônomo (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Embora plantas medicinais sejam pouco usadas na medicina tradicional com alternativas antioxidantes, elas apresentam características terapêuticas importantes tendo em vista sua capacidade de varredura de radicais livres comumente envolvidos em doenças. A síntese vegetal de metabólitos secundários antioxidantes com absorbância compatível entre 300 e 400nm é consideravelmente aumentada quando irradiada com luz UV. Isso proporciona um maior nível de proteção contra agentes oxidantes gerados por luz e calor (MORAIS *et al.*, 2006).

Inúmeros métodos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante em extratos vegetais, insumos e alimentos utilizados na indústria de medicamentos e alimentos. Contudo, devido à complexidade da composição de cada amostra a ser analisada, tendo em vista que antioxidantes não atuam separadamente, a possível interação entre eles, como por exemplo, o sinergismo, pode fazer com que a determinação da capacidade antioxidante individualmente seja menos efetiva do que o estado antioxidante total (PRIOR; CAO, 2000). Assim, apesar da grande variedade de metodologias para determinação da capacidade antioxidante, a susceptibilidade a interferências é um fator a ser considerado, sendo necessário o emprego de duas ou mais técnicas, pois nenhum método isolado poderia mensurar com exatidão a capacidade antioxidante total de uma amostra (HUAN *et al.*, 2005).

Uma das estratégias mais aplicadas nas medidas *in vitro* da capacidade antioxidante total de compostos consiste na determinação da atividade antioxidante frente a substâncias cromógenas de natureza radicalar em que o consumo da coloração é proporcional à concentração de antioxidantes (ARENA

et al., 2001). O método do DPPH (diphenyl-2-picrylhydrazyl) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) foi baseado na redução do radical DPPH na presença de antioxidante doador de hidrogênio. A molécula de DPPH foi caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. Este ensaio é baseado na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Ao se adicionar uma substância doadora de átomos de hidrogênio a uma solução de DPPH, a hidrazina é formada e simultaneamente ocorre a mudança de coloração de violeta a amarelo pálido. Este método tem sido considerado um dos mais representativos para o emprego em modelos de radicais na avaliação da capacidade de remoção de radicais livres (MOLYNEUX, 2004; ROGINSKI E LISSI, 2005; GENOVESE *et al.*, 2008) (FIGURA 9).

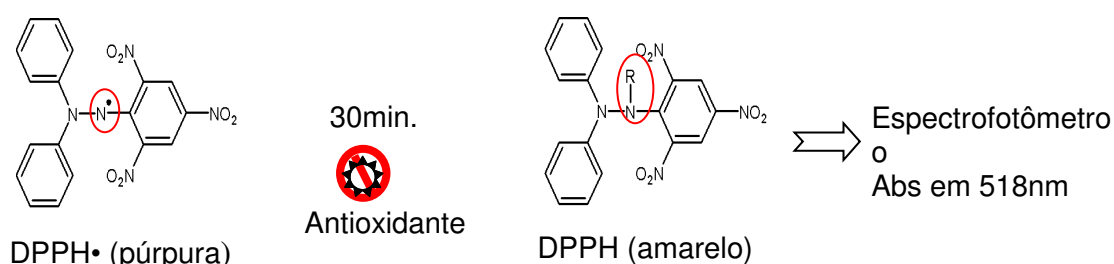


FIGURA 9 – ATIVIDADE SEQÜESTRADORA DO RADICAL LIVRE 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA - DPPH•

Compostos oxidantes e redutores são biologicamente conhecidos como pro-oxidantes e antioxidantes. Pro-oxidante é uma substância que pode induzir dano oxidativo a vários alvos biológicos como ácidos nucleicos (modificação de bases, simples ou dupla quebra de fita), lipídeos (peroxidação, perda de ácidos graxos) e proteínas (oxidação de resíduos de aminoácidos específicos, formação de carbonilas). Antioxidante é uma substância que reduz eficientemente um pro-oxidante com formação concomitante de um produto de baixa ou nenhuma toxicidade (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Uma definição mais ampla para antioxidante foi sugerida por Halliwell *et al.* (1995) como qualquer

substância que quando presente em baixa concentração comparado com as substâncias de um substrato oxidável previne ou retarda significativamente a oxidação do substrato.

As cumarinas são compostos naturais sabidamente antioxidantes, entretanto a relação estrutura – atividade ainda não é bem conhecida. Zhang e Wang (2004) descreveram que o grupo orto catecol e seus substituintes são os principais responsáveis pela ação antioxidante e não o anel 1,2 benzopirona. A substituição de um dos grupos hidroxila por grupo amina (*orto* hidroxiaminocumarinas) resulta em compostos com alta atividade antioxidante na peroxidação de lipídeos *in vitro*, superior àquela apresentada pelo α -tocoferol (TYAGI *et al.*, 2005).

3.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE PARASITISMO POR NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS EM PEQUENOS RUMINANTES

Plantas medicinais foram usadas para combater o parasitismo durante séculos e em muitas partes do mundo ainda são usadas para esse propósito. Na medicina etnoveterinária, que é inspirada pela medicina tradicional, existe uma gama de plantas e extratos vegetais apropriados para tratar a maioria das doenças parasitárias da pecuária (INTERNATIONAL INSTITUTE OF RURAL RECONSTRUCTION, 1994).

Neste sentido, diversos autores listam uma infinidade de espécies que apresentam relatos de propriedades medicinais (AKHTAR *et al.*, 2000; NUNDKUMAR e OJEWOLE, 2002; ATHANASIADOU e KYRIAZAKIS, 2004; FAJIMI e TAIWO, 2005; GITHIORI *et al.*, 2006). Como por exemplo, sementes de alho, cebola e menta são utilizadas para tratar animais acometidos por parasitismo gastrointestinal, enquanto que extrato de tabaco é empregado no tratamento tópico de ectoparasitas (GUARRERA, 1999).

A maioria das evidências de atividades antiparasitárias de plantas é tradicionalmente baseada em observações casuais, entretanto, um número cada vez maior de estudos experimentais buscam a verificação, validação e quantificação científica destas atividades. Uma dessas abordagens é o teste de

extratos e preparações derivadas de plantas em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Apesar dos esforços, um número considerável de plantas medicinais são avaliadas por estas metodologias *in vitro* e apresentam atividade significativa contra parasitas, entretanto, quando são experimentadas em rebanhos, ou seja, em testes *in vivo* não apresentam resultados equiparados aos observados *in vitro* (ATHANASIADOU, GITHIORI e KYRIAZAKIS, 2007).

O rebanho ovino brasileiro é de 17,6 milhões de cabeças (em dezembro de 2012). Dentro deste total, 56,7% do efetivo é encontrado nos estados do nordeste e no sul o efetivo é de 28,6%, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor (IBGE, 2013). A produção paranaense de ovinos de corte criados em sistema intensivo e semi-intensivo é destacada no país e apresenta o maior crescimento entre os rebanhos explorados zootecnicamente. De acordo com a Associação Paranaense de Criadores de Ovinos (OVINOPAR) possui um rebanho estimado entre 550 a 600 mil cabeças (4,12% do rebanho nacional), distribuído para cerca de 9.700 produtores em aproximadamente 17.200 propriedades (DE LUCA NETO, 2013). A ovinocultura, neste estado em especial, vivencia contínua contaminação ambiental devido aos estágios de vida livre dos parasitas, cujo índice elevado nas pastagens gera fonte de constante infecção no rebanho (THOMAZ-SOCCOL, 1996). Além disso, os prejuízos econômicos causados por parasitas gastrintestinais são mais sérios onde há intenso manejo de pastagem (DEMELETER *et al.*, 2009).

O parasitismo por nematóides gastrintestinais reduz a eficiência da cadeia produtiva de pequenos ruminantes diminuindo a produção de carne, leite, além de elevada mortalidade do rebanho no período chuvoso (PINHEIRO, 2000).

As infecções parasitárias representam o principal fator limitante na produtividade da ovinocultura e caprinocultura com alto índice de morbidade e mortalidade. Na perspectiva de minimizar os prejuízos o produtor utiliza fármacos antiparasitários em períodos curtos e regulares, como o tiabendazol, ivermectina, closantel entre outros (MELO e BEVILAQUA, 2005).

Em ruminantes a resistência anti-helmíntica tem maior prevalência entre os nematóides de ovinos e caprinos. O que pode ser explicado em parte pela maior frequência de tratamentos e ainda por diferenças fisiológicas entre pequenos e grandes ruminantes (GEARY, 1999). Estudos indicam resistência

generalizada a um ou mais agentes anti-helmínticos de largo espectro na maioria das criações pecuárias (DEMELEER *et al.*, 2009).

3.7.1 Família Trichostrongylidae

A família Trichostrongylidae é representada por vermes parasitas do trato gastrintestinal dos vertebrados. Apresentam ciclo evolutivo direto caracterizado em dois períodos, um no hospedeiro denominado fase parasitária e outro no ambiente conhecido como fase de vida livre como apresentado na Figura 10.

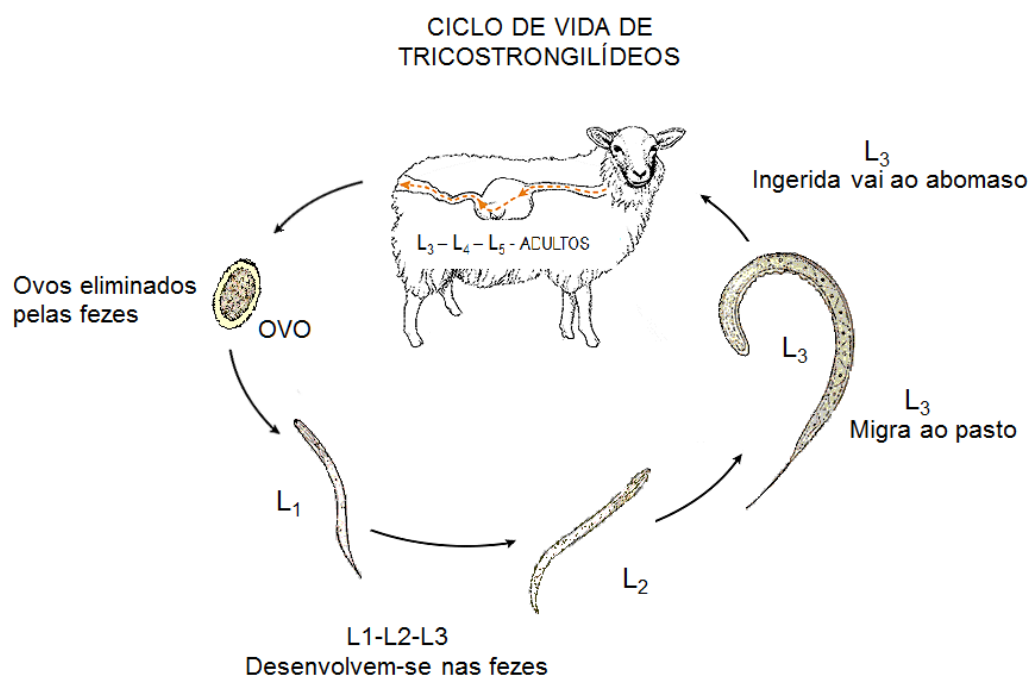


FIGURA 10 – CICLO DE VIDA DE TRICOSTRONGILÍDEOS

Legenda: L1 – primeiro estágio larval; L2 – segundo estágio larval; L3– terceiro estágio larval; L4 e L5 – vermes parasitas

FONTE: Disponível em <http://cal.vet.upenn.edu>, modificado pelo autor, 2013.

Vermes adultos vivem no abomaso do hospedeiro e as fêmeas fazem postura diária de ovos que são eliminados pelas fezes do animal. Em condições ótimas de temperatura e umidade os ovos se desenvolvem para o primeiro estágio larval (L₁), após a eclosão dos ovos as larvas desenvolvem-se ainda no bolo fecal para o segundo (L₂) e terceiro (L₃) estágios. A L₃, forma infectante, migra para a pastagem e quando ingerido pelo animal fixa-se no tubo digestório e evolui para a forma parasita (L₄) e (L₅), e então para a forma adulta macho ou fêmea. A postura dos ovos tem início entre 21 e 28 dias após serem ingeridas no estágio L₃ (ONYAH e ARSLAN, 2005; LIMA, 2008).

3.7.2 Hemoncose

A hemoncose é uma doença parasitária importante e tem como alvos principais os ovinos e os caprinos. Os sintomas mais comuns são diarreia, perda de peso, desidratação, pelos arrepiados e sem brilho (GIRÃO, GIRÃO E MEDEIROS, 1998). Na fase crônica, pode ser observada debilidade orgânica geral, edema submandibular, diminuição significativa na produção de leite e carne, anemia acentuada e morte (SANTA ROSA, 1996).

Os nematoides patogênicos de importância veterinária que infectam pequenos ruminantes pertencem aos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus* e *Cooperia*. E destes helmintos, *Haemonchus sp.* é a espécie que mais compromete a saúde dos ruminantes por se tratar de um parasita hematófago tanto na fase imatura como na fase adulta o que leva a uma anemia severa (URQUHART *et al.* 1996).

Haemonchus contortus (FIGURA 11) é o tricostrongilídeo parasita, em pequenos ruminantes, dominante no que se refere a intensidade de infecção. Os animais apresentam alta taxa de infecção e grande excreção de ovos de nematoides nas fezes (ACHI *et al.*, 2003). Os vermes adultos são facilmente observados pois medem de 1,0 cm a 2,5 cm de comprimento (CLIMENI, MONTEIRO e CICOTI, 2008).

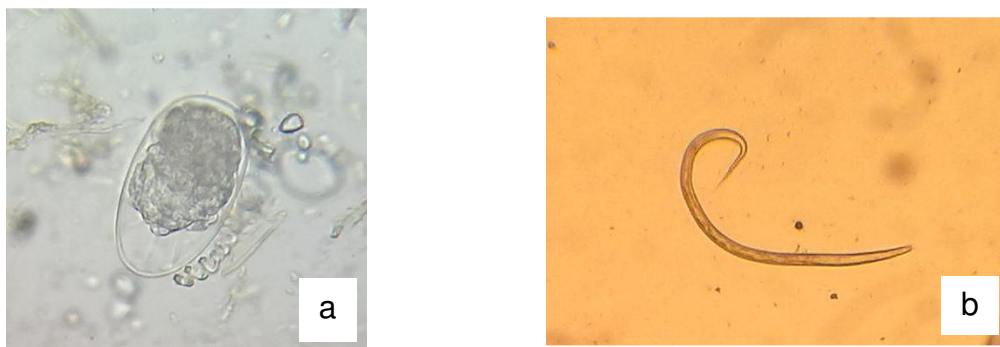


FIGURA 11 – OVO BLASTOMERADO E LARVA DE *Haemonchus contortus*

LEGENDA: a – Ovo blastomerado; b - larva

Fonte: O autor, 2011

Além disso, *H. contortus* é considerada a espécie de nematoide prevalente na resistência em ovinos a medicamentos anti-helmínticos, o que pode ser explicado pela forte pressão de seleção das drogas em populações parasitárias (MELO e BEVILAQUA, 2005; COLES *et al.*, 2005, SCHEUERLE, 2009; MOLENTO, 2011).

3.7.3 Plantas com atividade anti-helmíntica

O modo tradicional de controle do parasitismo gastrintestinal na pecuária em geral é baseado na repetição de medicamentos anti-helmínticos. Entretanto, a emergente resistência dos nematoides gastrintestinais a estas substâncias tem motivado a investigação de abordagens alternativas, como por exemplo a fitoterapia (ATHANASIADOU e KYRIAZAKIS, 2004; GITHIORI *et al.*, 2006). A fitoterapia se revela vantajosa no controle de parasitoses gastrintestinais por se tratar de produção de medicamento de menor custo e menor efeito colateral associado ao fato de ser de origem natural (CHAGAS *et al.*, 2008; DATSU KALIP *et al.*, 2011).

Lans *et al.* (2007) e Rahmann e Seip (2008) descrevem o uso de espécies de *Artemisia* (*Artemisia cina*, *Artemisia vulgaris*, *Artemisia annua*, *Artemisia herba-alba*, *Artemisia dracunculus* e *Artemisia abrotanum*) como anti-

helmínticos. Girão *et al.* (1998) avaliaram algumas espécies no nordeste brasileiro com atividade anti-helmíntica, entre elas: erva-lombrigueira (*Spigelia anthelmia* L.), lírio (*Melia azedarach* L.) e batata-de-purga (*Operculina cf. alata* Urban).

Tradicionalmente algumas plantas são conhecidas mundo afora pelas suas propriedades antiparasitárias contra nematoides gastrointestinais que acometem os animais (AGUILAR *et al.*, 2008; LÓPEZ AROCHE *et al.*, 2008; DE JESÚS GABINO *et al.*, 2010). Alguns exemplos mais conhecidos são o alho (*Allium sativum*) (IQBAL *et al.*, 2001; QADIR *et al.*, 2010), cravo-de-defunto (*Tagetes erecta*) (KRUEGER *et al.*, 2009; BHARDWAJ *et al.*, 2010) e erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) (YADAV *et al.*, 2007; EGUALE e MIRUTSE, 2009).

Em estudo com a cumarina (1,2 benzopirano) e seus derivados sintéticos, Tripathi *et al.* (2000) observaram que baseado nas suas propriedades anti-inflamatórias estes compostos apresentam atividade antifilarial, ou seja, são capazes de eliminar parasitas na fase adulta e assim se empregadas em parasitoses poderiam combater a inflamação e a infecção filarial concomitantemente (MONTAGNER, 2007).

Bravo *et al.*, (1999) relatam atividade antimalárica do extrato diclorometano de *Amburana cearensis* com EC₅₀ de 9 mg/mL. Deste mesmo extrato foi isolada uma cumarina que apresentou atividade contra *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani* em uma concentração de 50 mg/mL. Além disso apresentou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* (0,1 mg/mL) e *Shigella flexneri* (0,5 mg/mL) e atividade antifúngica.

3.7.4 Avaliação da atividade nematicida *in vitro*

Várias metodologias são utilizadas para testar a atividade nematicida tanto de medicamentos como de extratos vegetais. Os testes *in vitro* têm se mostrado relevantes e consideravelmente baratos quando comparados aos testes *in vivo* (MARIE-MAGDELEINE *et al.*, 2009). O teste de eclodibilidade de

ovos (TEO) (COLES *et al.*, 1992) e o teste de desenvolvimento larval (TDL) (HUBERT e KERBOEUF, 1992) são empregados para detectar resistência anti-helmíntica de nematoides gastrintestinais. Já os testes de inibição de migração larval (TIML) (WAGLAND *et al.*, 1992; RABEL *et al.*, 1994) e de motilidade de vermes adultos (TMVA) (HOUNZANGBE-ADOTE *et al.*, 2005) permitem uma real avaliação da atividade nematicida *in vivo*. Estes quatro testes são baseados na hipótese de que a atividade nematicida observada *in vitro* indica potencial atividade *in vivo* (MARIE-MAGDELEINE *et al.*, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Nos meses de janeiro e fevereiro de 2008 foram coletadas partes aéreas de *Pterocaulon alopecuroides* DC. no município de Piçarras, litoral de Santa Catarina. A coleta de *Pterocaulon lorentzii* Malme ocorreu nos meses de abril de 2009 e janeiro de 2010 no município de Guaratuba, litoral do Paraná. A determinação botânica foi feita no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, estado do Paraná pelo curador Osmar do Santos Ribas. As exsiccatas foram depositadas no referido museu e estão registradas sob os números 323448 (*P. lorentzii*) e 266085 e 266086 (*P. alopecuroides*).

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

A *screening* fitoquímico, ou seja o ensaio sistemático de análise em fitoquímica, foi realizada segundo Moreira (1979). Nesta investigação foram identificados cumarinas, flavonoides e triterpenos como compostos em maior concentração tanto para *P. alopecuroides* (HEEMAN, 2002) como para *P. lorentzii* (SASAKI, 2008).

O processo de extração do *P. alopecuroides* partiu de 1350g de material vegetal seco e triturado com rendimento total de 5,5%, e 1710g de material vegetal seco e triturado de *P. lorentzii* com rendimento total de 30,3%.

A obtenção dos extratos, das frações e da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina foi realizada conforme o fluxograma mostrado na Figura 12.

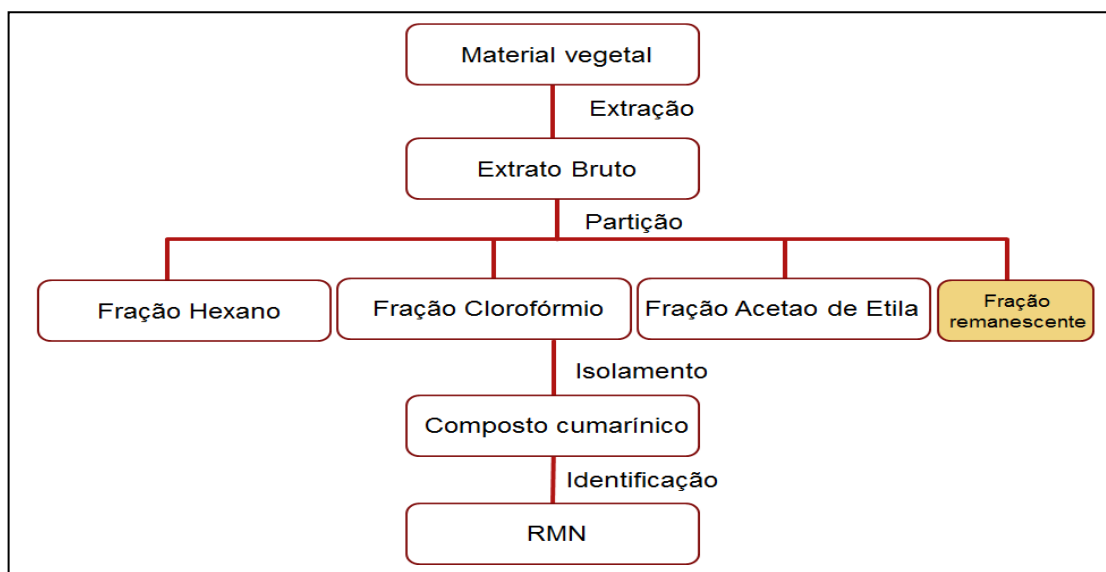


FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, DAS FRAÇÕES E DA 5-(2,3-DIHI-DROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA

4.2.1 Obtenção Dos Extratos

As amostras de material vegetal seco, estabilizado e moído foram pesadas e submetidas a extração separadamente em aparelho de Soxhlet farmacotécnico modificado segundo CARVALHO (2009) (FIGURA 13).

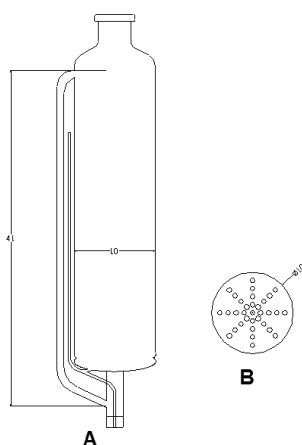


FIGURA 13 – SOXHLET FARMACOTÉCNICO MODIFICADO

LEGENDA: A – corpo do aparelho de soxhlet; B – peneira interna do aparelho de soxhlet

FONTE: CARVALHO, 2009

4.2.2 Obtenção das frações

O extrato bruto após ser concentrado foi particionado. A partição líquido-líquido dá-se em ordem crescente de polaridade utilizando aparelho de Soxhlet analítico modificado (CARVALHO, 2009) (FIGURA 14) com solventes (PA) de diferentes polaridades, na seguinte ordem: n-hexano, clorofórmio e acetato de etila. O material remanescente da extração e partição não foi utilizada neste estudo uma vez que o foco desta pesquisa foi a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina isolada da fração clorofórmio.

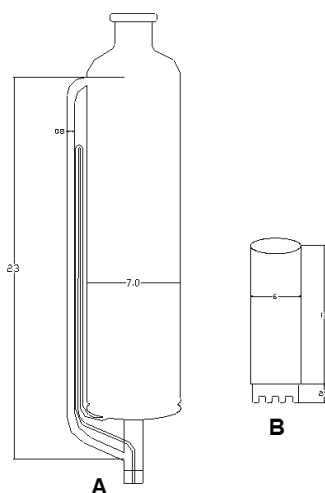


FIGURA 14 - SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO

LEGENDA: A – corpo do aparelho de soxhlet; B – cartucho interno do aparelho de soxhlet

FONTE: CARVALHO, 2009

4.2.3 Obtenção das substâncias isoladas

4.2.3.1 Cromatografia líquida em coluna

O processamento das frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila foi feito pela redissolução de cada fração concentrada em metanol e incorporada a 6g de sílica-gel 60 - Merck® – com tamanho de partícula 0,063-0,2mm, 70-230 mesh ASTM (cerca de uma vez o seu peso seco) para a

formação da pastilha de sílica. Essa pastilha foi submetida à cromatografia líquida em coluna de 30cm de altura por 3 cm de diâmetro, empacotada com 30g de sílica-gel 60 (0,063-0,200mm) Merck®. A amostra foi eluída em sistema de solventes com gradiente de polaridade crescente, sendo utilizados hexano, acetato de etila e metanol. O controle de eluição foi feito com lâmpada de luz UV a 360 nm. As características das frações recolhidas foram observadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasas de sílica-gel 60 F₂₅₄ Merck® e visualizadas com lâmpada UV nos comprimentos de onda de 360 nm. As frações semelhantes foram reunidas redissolvendo-as em clorofórmio e metanol.

4.2.3.2 Elucidação Estrutural

As precipitações decorrentes das reuniões das frações da eluição de cada coluna cromatográfica foram purificadas com solventes (clorofórmio e metanol) para posterior identificação. O método espectroscópico utilizado para identificar os compostos foi a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) em equipamento Bruker® a 200MHz e ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ¹³C) a 175 MHz DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* ou Intensificação do Sinal sem Distorção por Transferência de Polarização) realizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

4.3.1 Preparo da solução salina

A solução salina foi preparada utilizando-se 41g de sal marinho (23 g NaCl; 11 g MgCl₂·6H₂O; 4 g Na₂SO₄; 1,3 g CaCl₂·2H₂O ou CaCl₂·6H₂O; 0,7 g KCl) em 1000 mL de água purificada com pH ajustado entre 8 e 9.

4.3.2 Eclosão dos ovos

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados na água salgada para eclodir por 48 horas sob aeração contínua utilizando-se um agitador mecânico e expostos à luz diurna com temperatura controlada entre 27 e 30°C e pH monitorado.

4.3.3 Preparo das amostras

O estudo foi realizado com os extratos, as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila de ambas as espécies e a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina.

As amostras foram preparadas nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL em triplicata utilizando-se solvente adequado para solubilização da amostra. Os tubos preparados com os respectivos extratos, frações e substância isolada foram levados à estufa por 24h para total evaporação do solvente após o qual recebeu os microcrustáceos (MCLAUGHLIN; CHANG; SMITH, 1991).

4.3.4 Avaliação da toxicidade

Nos tubos contendo as amostras secas foi adicionado cerca de 1 mL de salina para os quais foram transferidos 30 náuplios vivos de *Artemia salina*. Além das amostras, foram preparados tubos para controle negativo em que se usou o solvente presente nas amostras e levado à secar e outro com controle salina (apenas salina). Foi utilizado ainda um tubo de controle positivo com

sulfato de quinidina. Todos os tubos tiveram seu volume final ajustado com salina para 2,5 mL.

Após 24 horas realizou-se a contagem dos náuplios mortos e vivos com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos (FINNEY, 1956) e determinados os valores de LC_{50} e 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas ativas quando LC_{50} foi menor que 1000 ppm (MEYER *et al.*, 1982).

4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA *in vitro*

4.4.1 Atividade hemolítica em sangue de carneiro

Esta avaliação foi feita de acordo com a metodologia para determinação de atividade hemolítica estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998) com adaptações. Neste ensaio foram testadas as amostras: extrato bruto, fração hexano, fração clorofórmio e fração acetato de etila das espécies em estudo *Pterocaulon lorentzii* Malme e *Pterocaulon alopecuroides* DC. assim como a cumarina isolada 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina.

Foi transferido 1 mL de sangue de carneiro para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com tampão fosfato pH 7,4 (Suspensão diluída 2%).

A solução pôde ser usada enquanto o líquido sobrenadante permanecia límpido e incolor e mantida fria.

Foi preparada a diluição em série das amostras vegetais com a solução tampão fosfato e suspensão de sangue 2% em 4 tubos a partir da concentração da amostra de 1000 µg/mL, conforme o Quadro 1 seguinte:

Tubo	1	2	3	4
Extrato vegetal (mL)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampão fosfato pH 7,4 (mL)	0,90	0,80	0,50	-
Suspensão de sangue (2%) (mL)	1,00	1,00	1,00	1,00

QUADRO 1 – RELAÇÃO DE diluição DAS AMOSTRAS PARA TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM SANGUE DE CARNEIRO

Agitou-se cuidadosamente os tubos evitando a formação de espuma e foram aguardados 30 minutos. Agitou-se novamente e deixou-se em repouso por 150 minutos para então ser centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos.

Observou-se então a formação de sedimento, depósito de eritrócitos, ou solução límpida e vermelha indicando hemólise total. Em caso de hemólise em algum dos tubos procedeu-se segundo Quadro 2 a seguir:

Tubo em que ocorreu hemólise	Procedimento
Apenas no 4	Usar extrato original para teste principal
Tubos 3 e 4	Diluir duas vezes o extrato vegetal com tampão fosfato
Tubos 2, 3 e 4	Preparar solução diluída 5 vezes

QUADRO 2 – OBSERVAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE HEMÓLISE NO TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM SANGUE DE CARNEIRO

Se após 6 horas todos os tubos apresentaram solução límpida e vermelha preparou-se uma solução diluída 10 vezes e fez-se o teste preliminar, como descrito acima.

4.4.2 Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue

Discos de papel Whatman número 1 foram impregnados com 10 µL a 20 µL de cada amostra testada na concentração de 1000 µg/mL. Estes discos

foram levados a secar em estufa a 50 °C e inoculados sobre placa de ágar sangue.

A incubação foi feita por 24 horas em estufa a 35 °C. O resultado se deu pela medida do halo formado no ágar sangue indicando o efeito da hemólise e comparado com os controles.

Como controle positivo utilizou-se solução 2% p/v de Triton também aplicado sobre o papel Whatman na concentração de 1000 µg/mL.

O controle negativo foi feito com solução salina 0,9%. Foi realizado em cada teste o controle do solvente empregado aplicando-o sobre papel e levando-o à estufa do mesmo modo.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Formação do complexo fosfomolibdênico

Esse ensaio baseou-se na técnica descrita por PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999). A reação para formação do complexo requer o preparo de um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1M, molibdato de amônio 0,03M e ácido sulfúrico 3M. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como a amostra testada foram usadas na concentração de 200 µg/mL em metanol (BIANCO, 2003).

Em um tubo de ensaio, colocou-se uma alíquota de 0,1 mL da amostra, e adicionou-se 1 mL de reativo. O mesmo foi feito para os padrões. Para o branco foi colocado em um tubo 0,1 mL de metanol e 1 mL de reativo. Neste ensaio foram avaliadas as amostras: extrato bruto, suas frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila de cada espécie *P. lorentzii* Malme e *P. alopecuroides* DC. assim como a substância isolada. A análise foi realizada em triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. Em seguida, manteve-se a série de tubos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, a leitura das absorbâncias (Abs) foi realizada em espectrofotômetro de UV em 695 nm. Os resultados foram expressos em

atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina, relação entre a diferença das absorbâncias da amostra e do branco pela diferença das absorbâncias da vitamina C (ou rutina) e o branco, multiplicados por 100 conforme equação (1).

$$AAR\% = \{[Abs_{(amostra)} - Abs_{(branco)}] / [Abs_{(Vit\ C.\ ou\ Rutna)} - Abs_{(branco)}] \times 100 \quad (1)$$

4.5.2 Avaliação da capacidade de reação com 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀) ou concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Para a análise qualitativa da atividade antioxidante os extratos foram analisados por CCD usando rutina como padrão positivo de comparação. As placas foram eluídas em CHCl₃/MeOH (9:1) e CHCl₃/MeOH/H₂O (65:30:5) e, após secagem, nebulizadas com solução a 0,4 mol/L do radical DPPH em MeOH. As placas foram então observadas até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura, indicativo de possível atividade antioxidante.

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo a metodologia descrita por MORENO *et al.* (2000), CHOI *et al.* (2002), ARBOS (2004), LU e FOO (2001), ADELMANN (2005) e BIANCO (2003), com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 518 nm, tendo como controle positivo rutina de 3 µg/mL a 5,5 µg/mL e vitamina C de 2 µg/mL a 5,5 µg/mL preparada em etanol.

4.5.2.1 Construção da curva de calibração do DPPH

Inicialmente, foram preparados 50 mL de solução estoque de DPPH 1mM em metanol, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Amostras (em triplicata) no intervalo de concentrações de 5 µg/mL a 500 µg/mL foram adicionadas a 0,1 mL da solução de DPPH e deixadas reagir em repouso por 30 minutos na temperatura ambiente e na ausência total da luz. As mesmas soluções amostra sem reagir com DPPH constituíram o branco da reação. Após os 30 minutos foi feita a leitura das absorbâncias em 518nm. O controle positivo foi feito pela medida da absorbância da solução de DPPH. Os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (EC_{50}) foram calculados no gráfico em que a abscissa representa a concentração do branco e a ordenada a média da AA% das 3 amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo $y = ax + b$, foi a base para determinação do valor de EC_{50} .

A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi medida pela relação entre a diferença das absorbâncias da amostra e do branco pela absorbância do controle positivo subtraídos de 100 conforme a equação (2) seguinte.

$$AA\% = 100 - \{ [Abs_{(amostra)} - Abs_{(branco)}] / Abs_{(controle)} \} \times 100 \quad (2)$$

4.5.3. Teste de atividade antioxidante pelo método de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este ensaio foi realizado conforme descrito em De Moraes *et al.* (2006). Para este teste foi utilizado gema de ovo de galinha homogeneizada como fonte de lipídeos. Em 5 tubos foram colocados 0,5mL de solução aquosa de gema (10%*m/v*), 0,1mL da amostra testada dissolvida em metanol e 0,4mL de água perfazendo um total de 1 mL em cada tubo de ensaio. O teste foi

realizado em quintuplicata e as amostras foram testadas em 3 concentrações diferentes: 100, 500 e 1000 ppm (m/v).

Em seguida foi colocado em cada tubo:

- 0,05 mL de cloreto 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (ABAP) (0,07 mol/L) para induzir a peroxidação dos lipídeos;
- 1,5 mL de solução 20% de ácido acético (pH 3,5);
- 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,8% m/v) em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) (1,1% m/v).

No tubo controle foram colocados todos os reagentes com exceção da amostra cujo volume foi substituído por água, para observação da peroxidação total dos lipídeos. Os tubos de ensaio foram levados para banho-maria à 95 °C por 1 hora sob agitação. Após este período os tubos foram resfriados e a eles acrescentados 5 mL de 1-butanol e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos.

Como padrão positivo usou-se os antioxidantes BHT (butil-hidroxitolueno) e α -tocoferol.

Foi feita a leitura da camada orgânica superior do tubo em espectrofotômetro com comprimento de onda de 532 nm. O Índice Antioxidante (IA%) foi obtido pela equação (3) seguinte em que C é a absorbância do controle totalmente oxidado e A é a média aritmética das absorbâncias das amostras. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com $P < 0,05$.

$$IA\% = (1 - A/C) \times 100 \quad (3)$$

4.6 EFICÁCIA DOS EXTRATOS E SUBSTÂNCIA ISOLADA DE *P. alopecuroides* E *P. lorentzii* NA INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS OVOS DE NEMATÓIDES DE OVINOS E NO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR (MODIFICADO)

4.6.1 Teste de eclodibilidade de ovos de nematoides *in vitro*

A metodologia usada para este ensaio foi uma versão adaptada do teste de eclodibilidade, para determinação de resistência anti-helmíntica, proposto pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP) (COLES *et al.*, 1992).

4.6.1.1 Triagem do animal e avaliação da carga parasitária

Para este ensaio foi utilizado um ovino (fêmea) de propriedade particular naturalmente parasitado mantido em sistema semi-intensivo no Jockey Club do Paraná no município de Curitiba (PR) com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR sob protocolo 061/2011 (ANEXO 1). E as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR sob supervisão do Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento.

O animal doador de material fecal possuía alta carga parasitária com elevada contagem de ovos por grama de fezes (OPG), ($OPG \geq 2000$) e estava sem tratamento antiparasitário a mais de 20 dias antes da coleta. Uma pequena porção de material fecal foi retirada diretamente da ampola retal do animal com o uso de luva de procedimento e armazenado em recipiente plástico.

A obtenção e quantificação dos ovos de helmintos foi feita segundo o método de Gordon e Whitlock modificado (UENO e GUTIERRES, 1983).

Para a contagem de OPG, 2 gramas de fezes foram triturados num pequeno recipiente plástico com auxílio de espátula plástica. Foram adicionados 28mL de solução salina hipertônica (35%) e homogeneizado. O material foi peneirado sobre uma gaze de malha de 10 fios contida em uma peneira doméstica e o líquido recolhido em outro recipiente. O material retido foi descartado e da solução recolhida foi coletado volume suficiente com pipeta de Pasteur para preencher uma câmara de Neubauer. Em microscópio óptico com aumento de 40 vezes, foi feita a leitura da câmara e contados os ovos de helmintos. O número resultante foi multiplicado por 50 para se obter a quantidade ovos presentes em um grama de fezes.

4.6.1.2 Obtenção de Ovos de Nematoides de Ovinos

Os ovos foram recuperados segundo a metodologia descrita por Bizimenyera, *et al.* (2006), que é uma adaptação de Coles, *et al.* (1992). Da mesma maneira como foi feito para a coleta de material para o teste de OPG, cerca de 50g de material fecal foi recolhido diretamente da ampola retal do animal selecionado e acondicionado em recipiente plástico com isolamento térmico para que não houvesse diminuição na temperatura do material.

Nesta etapa, duas grandes variáveis influenciaram no êxito do ensaio, o tempo e a temperatura. A temperatura do material fecal desde a coleta até o final do ensaio foi mantida entre 25°C a 28°C, para assegurar o desenvolvimento dos ovos. Por este motivo, durante o preparo da solução de ovos todos os materiais empregados foram aquecidos a uma temperatura entre 25°C e 28°C. Isto porque a partir do momento em que as fezes são retiradas da ampola retal, inicia-se o desenvolvimento dos ovos para a formação das larvas, por isso para que o teste não apresente um falso resultado, todo o procedimento de preparo da solução de ovos não deve ultrapassar duas horas.

As fezes então foram colocadas em graal, trituradas com auxílio de pistilo e homogeneizadas com água aquecida a 40°C (água proveniente do

sistema de abastecimento municipal). A lavagem das fezes foi feita através de uma série de tamises de diferentes aberturas (250µm, 150µm, 75µm e 25µm). Os ovos de helmintos ficaram retidos na última malha (25µm) e foram recuperados com água destilada aquecida (40°C).

A lavagem dos ovos foi seguida por duas centrifugações em que a primeira foi feita apenas com água destilada a 3000 rpm por 5 minutos. O peso dos ovos faz com que durante a centrifugação eles sejam depositados no fundo do tubo, por isso para a segunda etapa da lavagem desprezou-se o sobrenadante e completou-se os tubos com solução salina hipertônica. Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi despejado sobre o tamis de 25 µm e lavado em abundância com água destilada aquecida para a retirada do sal.

Após a lavagem os ovos foram recolhidos em um béquer para a contagem. A solução de ovos foi homogeneizada e uma alíquota de 20 µl foi colocada em uma lâmina para a leitura em microscópio óptico num aumento de 10 vezes. Foram contados os ovos presentes nestes 20 µl e observado a presença de sujidades e contagem do número de ovos. Fragmentos de fezes presentes nesta solução não interferem no desenvolvimento do ensaio, entretanto podem dificultar a leitura final das placas. Soluções de ovos insuficientemente limpas tiveram a lavagem repetida. A partir da contagem dos ovos na lâmina, calculou-se o volume necessário de solução para a obtenção 100 ovos.

4.6.1.3 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)

Esta técnica foi adaptada a partir da metodologia descrita por Coles *et al.* (1992). Em placas de 24 poços foram colocados os tratamentos (extratos e frações de *P. lorentzii* e *P. alopecuroides*) nas concentrações de 500, 250, 100, 50, e 2 µg/mL em seis repetições e 100 ovos foram colocados em cada poço.

Em todos os ensaios foram testados os controles negativos: metanol 2,5% e água destilada; e o controle positivo, Albendazol 25µg/mL.

As placas foram então tampadas, identificadas e acondicionadas em estufa incubadora refrigerada tipo B.O.D. à 27°C ± 1 e umidade relativa

superior a 80% por 24 horas. Após este período uma gota de solução de Lugol foi adicionada em cada poço para interromper a eclosão dos ovos. Os ovos e as larvas L₁ livres em cada poço foram contadas em microscópio invertido com aumento de 20 vezes para o cálculo da porcentagem de inibição da eclodibilidade larval. O teste foi considerado válido para eclodibilidade no controle negativo maior que 90%. Segundo o índice de eficácia proposto pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP) um produto é efetivo quando promove acima de 90% de ação anti-helmíntica; moderadamente efetivo entre 80 a 90%; pouco efetivo quando a ação é entre 60 e 80% e não efetivo em níveis abaixo de 60% (POWERS *et al.*, 1982). Neste estudo foi determinado a concentração eficaz (EC₅₀) para uma melhor comparação da eficácia das amostras testadas.

A análise estatística foi feita de acordo com Coles *et al.* (2002).

4.6.2 Teste de Migração de Larvas em Agar (Modificado)

4.6.2.1 Triagem do animal e avaliação da carga parasitária

O animal utilizado neste ensaio foi o mesmo utilizado para o teste de eclodibilidade de ovos de nematoides e a triagem e a avaliação da carga parasitária seguiram os mesmos protocolos descritos no item 4.6.1.1.

4.6.2.2 Obtenção de Larvas (L₃) de Nematoides de Ovinos

Para a obtenção das larvas de terceiro estágio (L₃) o animal foi confinado em sua baia durante um dia e as fezes acumuladas foram coletadas para realização de coprocultura.

A coprocultura, realizada de acordo com Roberts e O'Sullivan (1950), foi feita umedecendo-se o material fecal com água e acondicionando-o em frascos

de vidro semi tampados e incubados em câmara tipo B.O.D. (25° - 27°C e UR >80%) por 7 dias, período no qual os ovos de nematoides eclodem dando origem às larvas L₁ que se desenvolvem para L₂ e em seguida para L₃. Para recuperar as larvas de nematoides foi colocada água suficiente para encher o frasco, coberto com placa de petri e então este sistema foi invertido. Na placa de petri foi colocado aproximadamente 10 mL de água (à temperatura ambiente) para a migração das larvas de dentro do frasco para a placa de Petri. Após 2 horas fez-se a coleta do líquido contido na placa de Petri com uso de pipeta de Pasteur para de decantação em cálice e consequente concentração das larvas presentes. A coprocultura indicou presença de 23,6% de *Haemoncus* sp. e 76,4% de *Trichostrongylus* sp.

4.6.2.3 Teste de Migração de Larvas em Agar (TMLA)

O efeito avaliado no teste de migração larval está diretamente relacionado à paralisia da musculatura das larvas de nematoides em terceiro estágio (L₃) (DEMELETER *et al.*, 2010).

Esta metodologia foi originalmente descrita por D'ASSONVILLE *et al.* (1996), modificada por MOLENTO e PRICHARD (2001) e empregada neste estudo com algumas alterações.

As larvas (L₃) obtidas na coprocultura foram desembainhadas com solução de hipoclorito de sódio 20%. Este processo foi acompanhado em microscópio óptico até a perda da bainha das larvas. A solução foi lavada 3 vezes com água destilada por centrifugação a 3000 rpm por 2 minutos.

Em cada poço da placa de 24 poços foram colocadas 400 larvas e o volume completado com água para 500 µl. Em seguida foram adicionados aos poços 500 µl das soluções teste em 5 concentrações (500; 250; 100; 50; 10µg/m) e em triplicata.

As placas foram homogeneizadas manualmente e incubadas em estufa B.O.D. à 27°C ± 1 e umidade relativa superior a 80% durante 6 horas. Após este período foi adicionado 1mL de solução de ágar 1,4% à 40°C em cada poço e imediatamente todo o volume do poço (ágar, solução tratamento e

larvas) foi transferido para um aparato previamente preparado (FIGURA 15). Este aparato consiste em uma placa de petri com tampa contendo duas malhas plásticas, uma com abertura de 1000 μm e outra de 500 μm ; sobre as malhas um cilindro plástico com 1 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro; e 20 mL de água destilada congelada.

Os aparatos foram incubados novamente em B.O.D. nas mesmas condições por 18 horas e abaixo deles foi colocado um ponto de luz incandescente de 150 MHz para estimular a motilidade das larvas viáveis do ágar em direção à água passando pelas malhas plásticas num. A porção líquida contendo as larvas foi transferida para tubos de falcon e centrifugados a 3000 rpm por 2 minutos. O volume foi reduzido para 2 mL para a transferência das larvas para placas de 24 poços para a contagem em microscópio invertido em aumento de 20 vezes.

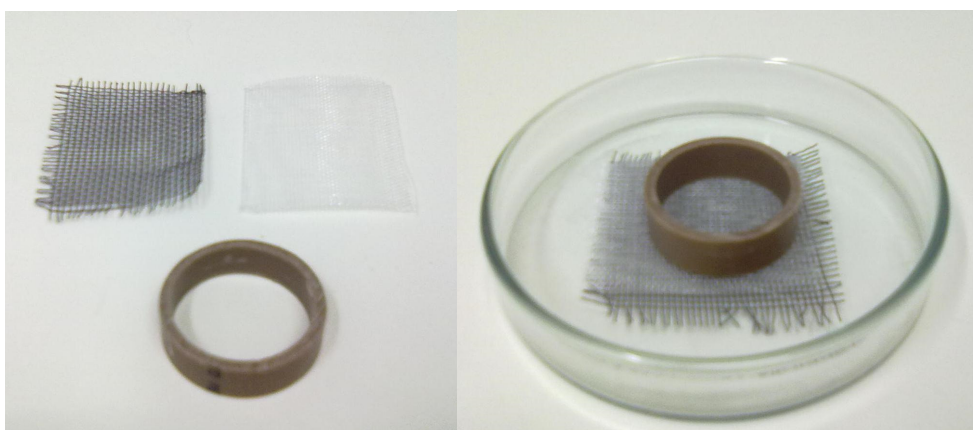


FIGURA 15 – APARATO PARA O TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR (MODIFICADO)
FONTE: O autor, 2011.

Todas as larvas que migraram do ágar para a água foram contadas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey (COLES *et al.*, 2002) e construção de curva dose-resposta pelo programa GraphPad Prism® 5 para Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA

5.1.1 Obtenção dos Extratos e Frações

Os materiais vegetais de *P.alopecuroides* e *P. lorentzii* foram secos separadamente em estufa à temperatura de 50 °C com circulação de ar forçada e então triturados. Foram utilizados neste processo 1350g de *P.alopecuroides* e 2040g de *P. lorentzii*.

A obtenção do extrato bruto foi feita utilizando aparelho de Soxhlet modificado farmacotécnico (CARVALHO, 2009) e álcool etílico 96°GL foi utilizado como líquido extrator. Após 6 horas de extração o menstruo foi filtrado e então concentrado no próprio aparelho de Soxhlet (FIGURA 16 - a). A partição líquido-líquido deu-se em ordem crescente de polaridade com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila, utilizando aparelho de Soxhlet analítico modificado conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato de capacidade para 500 mL, com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo contínuo por um período de 6 horas, segundo CARVALHO (2009) (FIGURA 16-b).

Desta maneira foram obtidos o extrato bruto (EB) e seu resíduo (EBR), a fração hexânica (FH), a fração clorofórmica (FC), a fração acetato de etila (FA) e a fração remanescente (FR) de *P. lorentzii* e *P. alopecuroides*.

Os testes biológicos, a análise cromatográfica e isolamento de substância foram realizados utilizando-se as amostras extrato bruto (EB), a fração hexânica (FH), a fração clorofórmica (FC) e a fração acetato de etila (FA) de cada espécie.



(a)



(b)

FIGURA 16 – EXTRAÇÃO E PARTIÇÃO EM APARELHO DE SOXHLET MODIFICADO
FONTE: (a) soxhlet farmacotécnico modificado, MIGUEL, 2006; (b) soxhlet analítico modificado, o autor, 2009.

5.1.2 Isolamento das Substâncias

As frações hexano, clorofórmio e acetato de etila de *P. lorentzii* Malme e *P. alopecuroides* DC. foram submetidas à cromatografia líquida em coluna para obtenção de substâncias isoladas e sua posterior identificação por ressonância magnética nuclear.

Em estudos anteriores foi isolada e identificada a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina de *P. lorentzii* (SASAKI, 2008) e de *P.*

alopecuroides (HEEMANN, 2006) que direcionou sua obtenção para os ensaios biológicos propostos para este trabalho. As características das frações recolhidas na cromatografia líquida em coluna foram observadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasmas de sílica-gel 60 F₂₅₄ Merck® e visualizadas com lâmpada UV nos comprimentos de onda de 360 nm o que permitiu a reunião das frações semelhantes para a cristalização da cumarina.

A 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina, cristalizada nas subfrações da cromatografia líquida em coluna da fração clorofórmio, foi purificada com solventes clorofórmio e metanol. A partir da fração clorofórmio de *P. alopecuroides* foram obtidos 70,7mg e da fração clorofórmio de *P. lorentzii* 1,433g da cumarina. A identificação foi feita por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) (a) e carbono (RMN ¹³C) (b) e demonstradas nas Figuras 17 a 20.

a) Espectro de RMN de ¹H da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina

O espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H foi obtido a uma frequência de 200MHz em MeOD e apresenta δ em ppm, 8,22 (1H, d), 6,58 (1H, s), 6,22 (1H, d) 6,05 (2H, s), 4,32 (1H, dd), 4,23(1H, dd), 3,74 (1H, dd), 1,24 (3H, s), 1,20 (3H, s) (FIGURA 17).

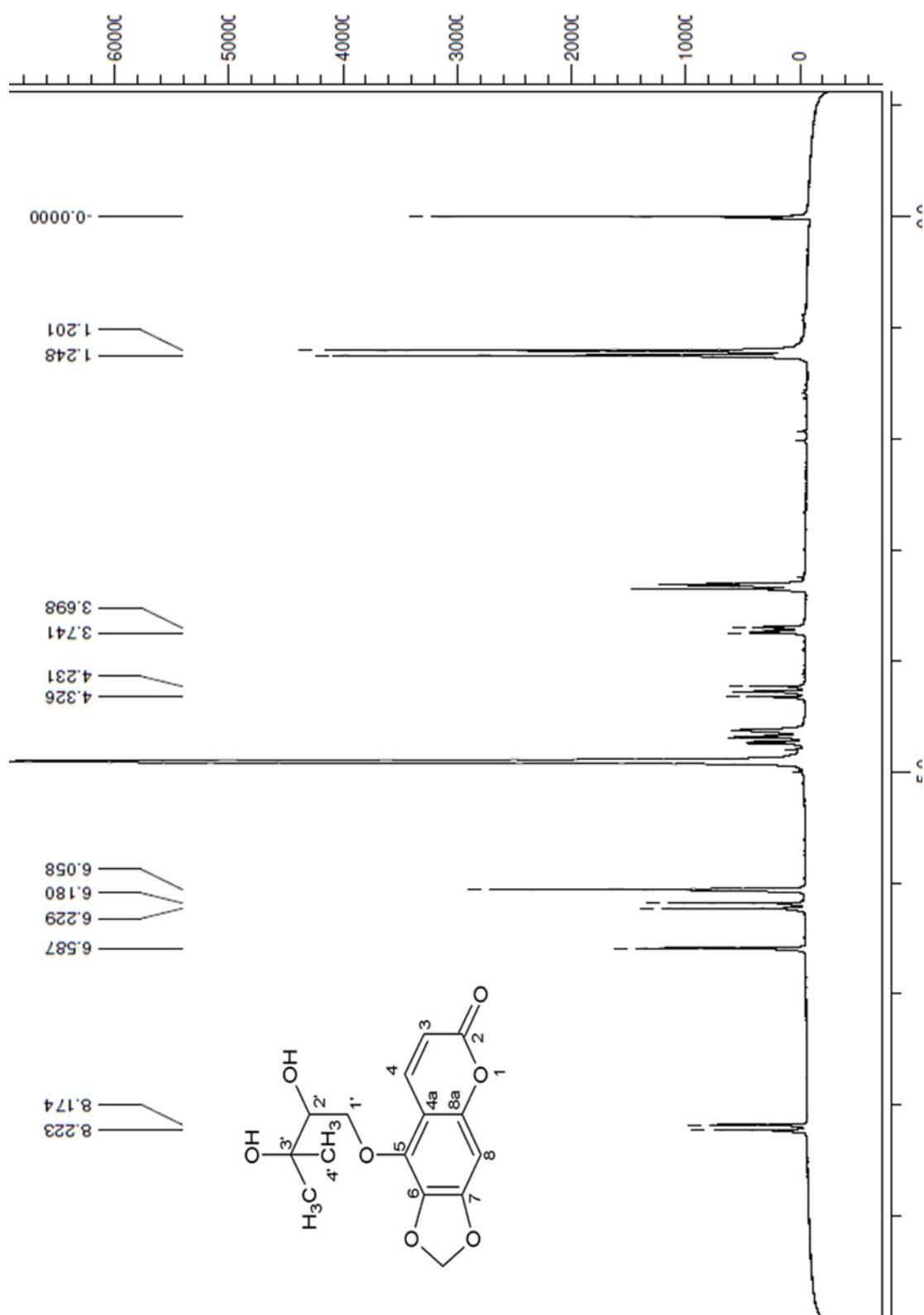
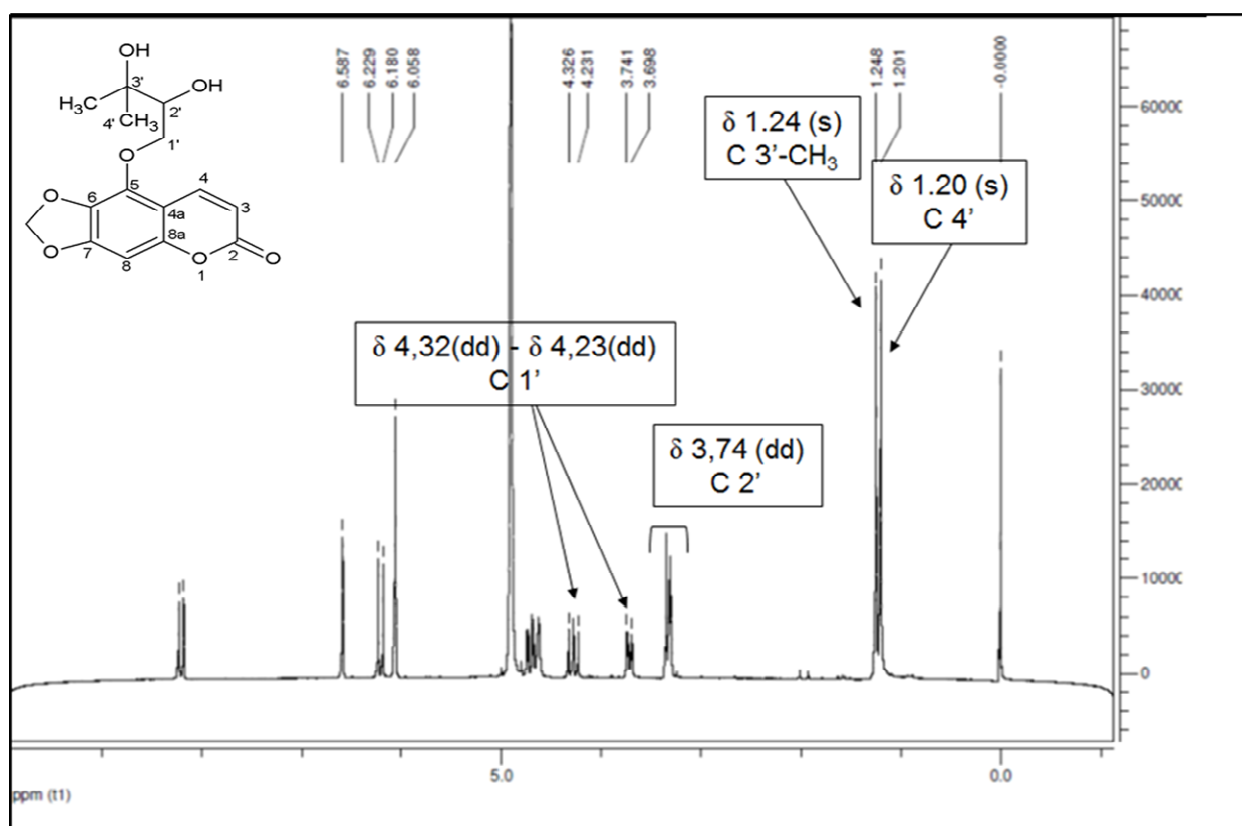


FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA

A



B

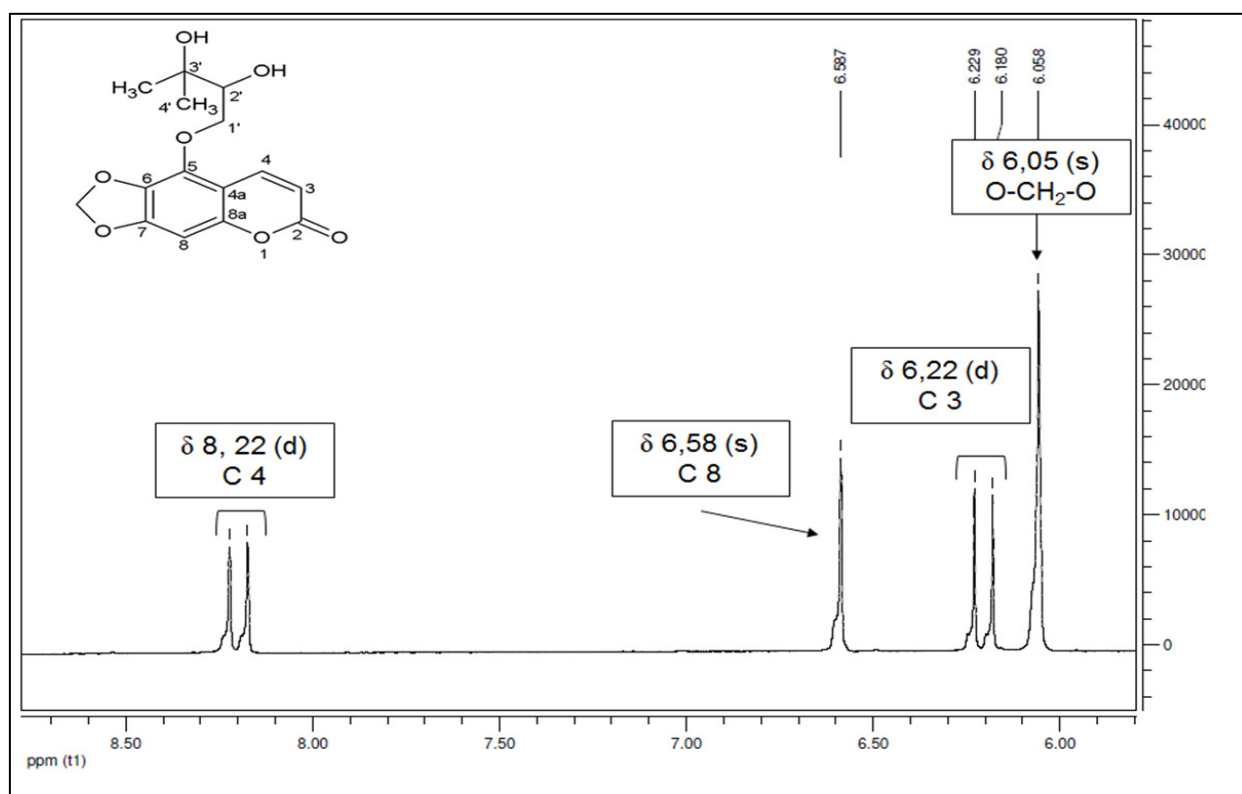


FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN DE ¹H DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTOLOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA EXPANDIDO DE δ 1-8ppm (A) E δ 6-8ppm (B)

b) Espectro de RMN de ^{13}C da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina

O espectro de RMN de ^{13}C (DEPT) estão demonstrados nas Figuras 19 e 20 e os deslocamentos químicos obtidos na frequência de 75 MHz em CDCl_3 podem ser observados na Tabela 1.

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^{13}C DA 5-(2,3-DIHIIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA OBTIDOS COM A LITERATURA

CARBONO	Deslocamento químico obtido	Debenedetti (1997)	Heeman (2002)
2	161,7	161,18	160,70
3	110,5	112,14	111,47
4	139,9	138,58	139,18
4a	107,2	106,97	107,15
5	136,9	136,77	135,28
6	132,6	132,23	132,41
7	151,8	151,52	151,73
8	91,7	93,14	92,22
8a	152,7	152,43	152,81
O-CH ₂ -O	102,3	102,06	102,32
1'	73,5	73,76	75,15
2'	76,5	71,61	77,37
3'	71,8	76,46	71,35
4'	25,4	26,72	27,31
3'-CH ₃	23,5	24,82	25,56

Os dados observados para os deslocamentos químicos da cumarina isolada neste trabalho são compatíveis aos dados relatados na literatura para esta substância. Fato este que ratifica a elucidação estrutural proposta.

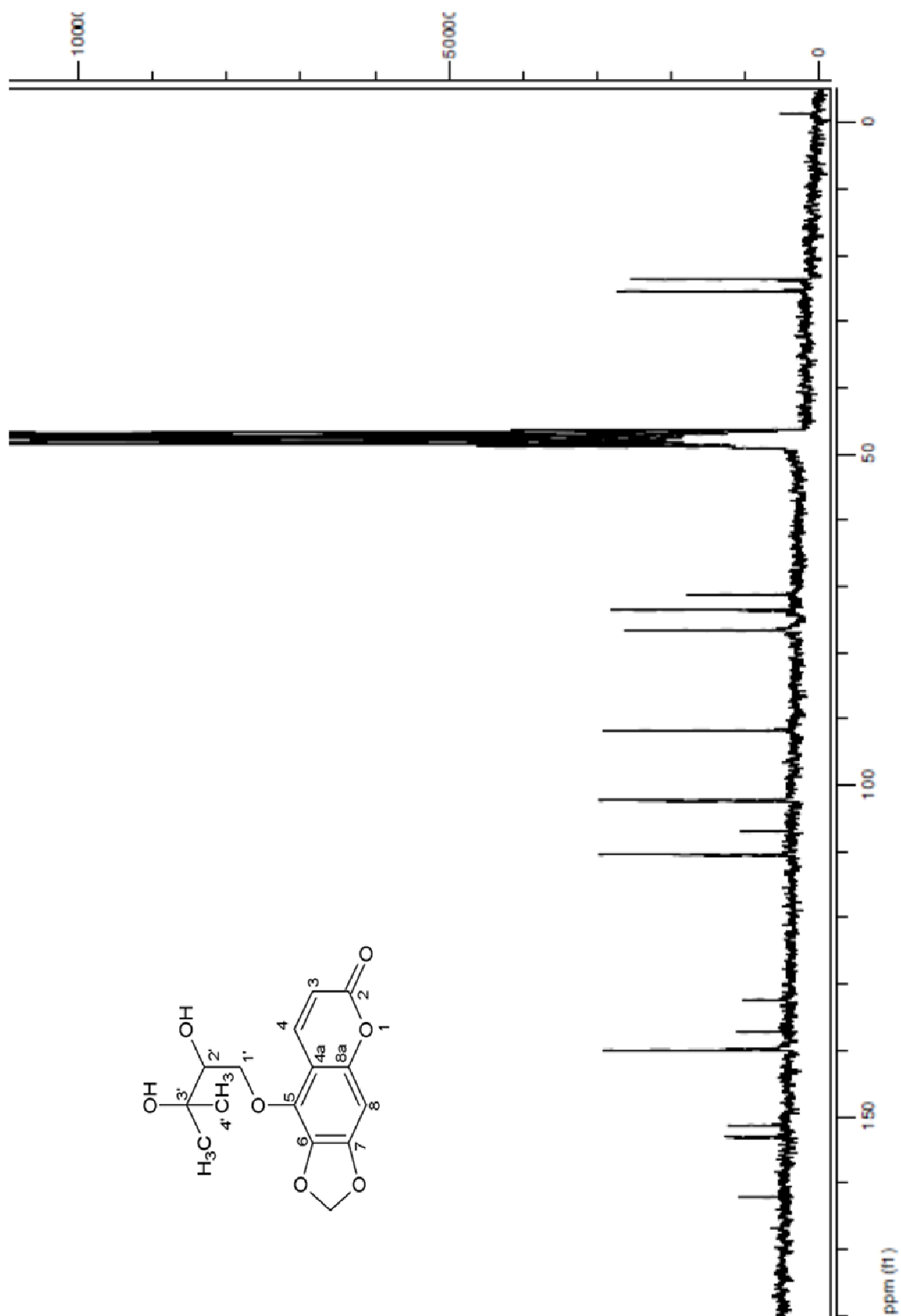


FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA

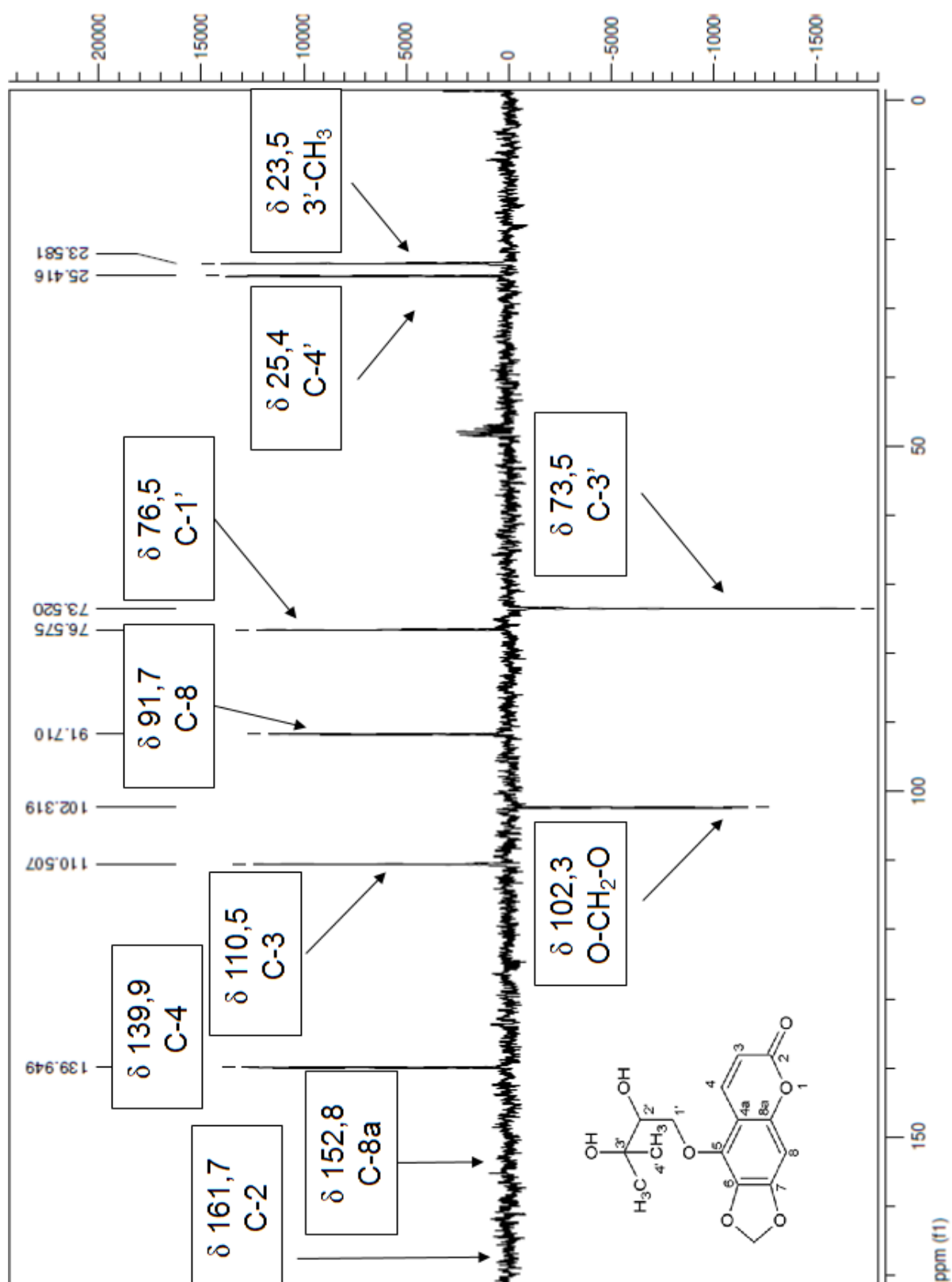


FIGURA 20 - DEPT DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTOLOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA

5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Foram submetidas a este ensaio as amostras EB, FH FC e FA de *P. alopecuroides* e de *P. lorentzii* assim como 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina (TABELA 2).

TABELA 2 – MORTALIDADE DE *Artemia salina* E ESTIMATIVA DE LC₅₀

Amostra		Concentração µg/mL	Mortalidade nas repetições					LC50 (µg/mL)	Intervalo de confiança
			C1	C2	1	2	3		
Pterocaulon alopecuroides	EB	10	0	0	0	2	0	> 1000	—
		100	0	0	0	0	4	> 1000	—
		1000	0	1	0	1	1	> 1000	—
	FH	10	0	0	0	2	1	> 1000	—
		100	0	0	1	2	2	> 1000	—
		1000	0	1	0	1	0	> 1000	—
	FC	10	0	1	0	0	1	> 1000	—
		100	0	0	0	2	3	> 1000	—
		1000	0	0	2	0	2	> 1000	—
	FA	10	0	1	0	1	2	> 1000	—
		100	0	0	0	0	2	> 1000	—
		1000	0	0	0	3	2	> 1000	—
Pterocaulon lorentzii	EB	10	0	0	0	1	0	> 1000	—
		100	0	0	0	0	1	> 1000	—
		1000	0	0	1	0	2	> 1000	—
	FH	10	0	0	0	0	0	> 1000	—
		100	0	0	0	1	0	> 1000	—
		1000	0	0	3	2	0	> 1000	—
	FC	10	0	1	0	0	0	> 1000	—
		100	0	0	0	2	3	> 1000	—
		1000	0	0	2	0	2	> 1000	—
	FA	10	0	1	0	1	1	> 1000	—
		100	0	0	0	0	2	> 1000	—
		1000	0	0	0	3	2	> 1000	—
Cumarina	10	0	1	0	0	0	> 1000	—	
Isolada	100	0	0	1	0	0	> 1000	—	
	1000	0	0	0	2	1	> 1000	—	

Nota : LC₅₀ = concentração média letal

C1 = controle 1, tubos tratados com salina

C2 = controle 2, tubos tratados com solvente do teste

Mortalidade: expresso em número de náuplios mortos após 24h de incubação

As amostras testadas avaliadas pelo método estatístico Probitos são consideradas inativas segundo MEYER *et al.*, 1982 pois, os valores de LC₅₀ não se encontram no intervalo de 10 µg/mL a 1000 µg/mL, portanto considera-se que a dose letal média para estas amostras são superiores a 1000 µg/mL. Do mesmo modo não houve mortes nos controles. Assim pode-se dizer que as amostras EB, FH, FC, FA de *P. alopecuroides* e *Pterocaulon lorentzii* e 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina não apresentam toxicidade frente à *Artemia salina* neste ensaio.

Até o momento não foram identificados relatos de ensaios de ecotoxicidade com o gênero *Pterocaulon*. Os dados obtidos neste ensaio são importantes para a avaliação do seu impacto no meio ambiente e para o teste destes extratos e frações em ensaios toxicológicos específicos.

5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

5.3.1 Atividade hemolítica em sangue de carneiro

Neste ensaio foram testadas as amostras extrato bruto (EB), fração hexano (FH), fração clorofórmio (FB) e fração acetato de etila (FA) das espécies *P. lorentzii* Malme e *P. alopecuroides* DC. e a cumarina isolada. Como solvente das amostras foi utilizado etanol 10% que nesta concentração não apresentou atividade hemolítica, como controle negativo foi utilizado tampão fosfato e como controle positivo água destilada.

Apenas as frações hexano (FH) e clorofórmio (FC) de ambas espécies apresentaram atividade hemolítica nos tubos 3 e 4, ou seja nas concentrações de 500 µg/mL e 1000µg/mL. Ressalta-se aqui que é considerado teste positivo apenas quando não há nenhum depósito de hemácias no fundo do tubo.

5.3.2 Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue

Foram aplicadas em cada disco Whatmann nº1 20µl de amostra a uma concentração de 1000 µg/mL em duplicata. As amostras aplicadas de cada espécie foram: extrato bruto, fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e a cumarina isolada.

Os discos de papel impregnados foram colocados em placas de ágar sangue comerciais NEWPROV®. Os resultados podem ser observados nas Figuras 21 a 24.

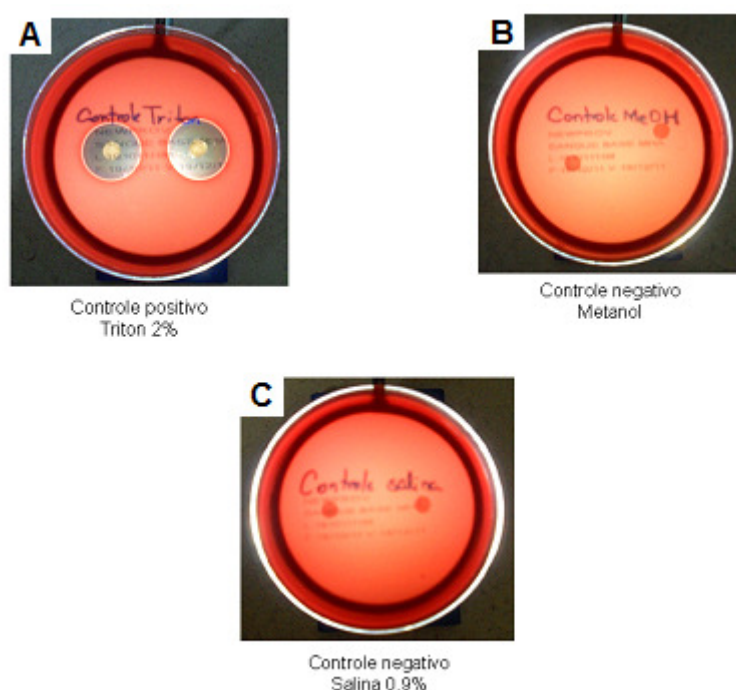
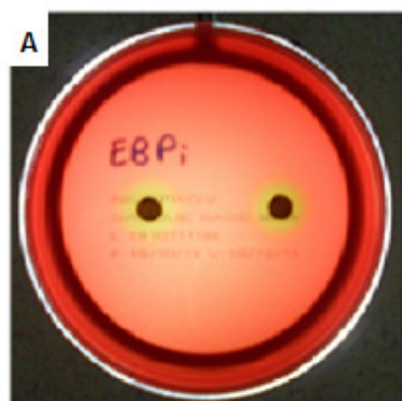
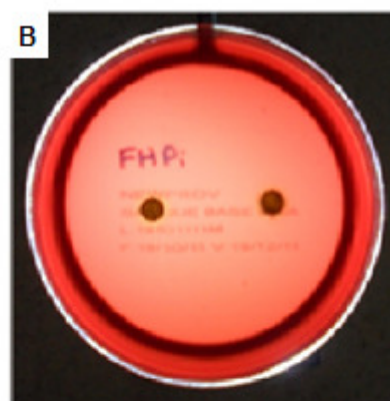


FIGURA 21 – PLACAS DE ÁGAR SANGUE DOS CONTROLES: POSITIVO TRITON 2% (A) E NEGATIVOS METANOL (B) E SALINA 0,9% (C)
FONTE: O autor, 2009.

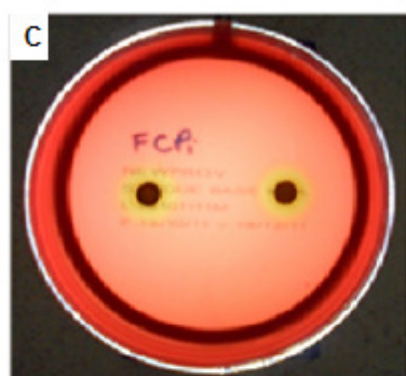
No controle positivo é observado facilmente o halo formado pela hemólise causada pelo Triton 2%, o que não ocorre nos controles negativos salina 0,9% e metanol.



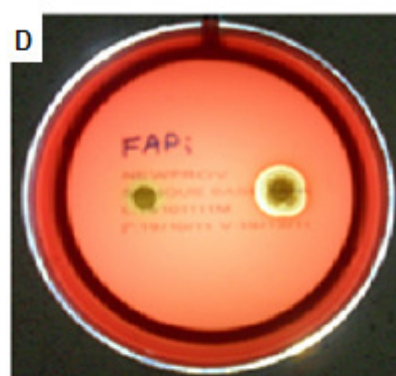
Extrato Bruto
P. alopecuroides



Fração Hexano
P. alopecuroides

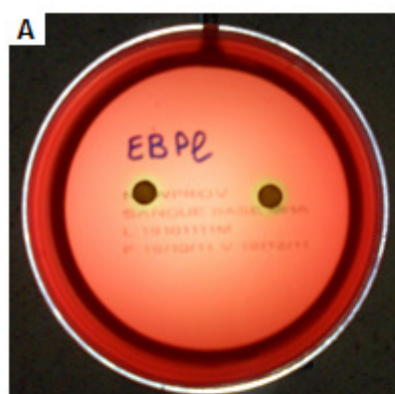


Fração Clorofórmio
P. alopecuroides

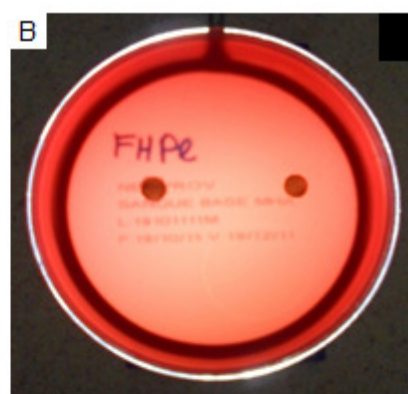


Fração Acetato de Etila
P. alopecuroides

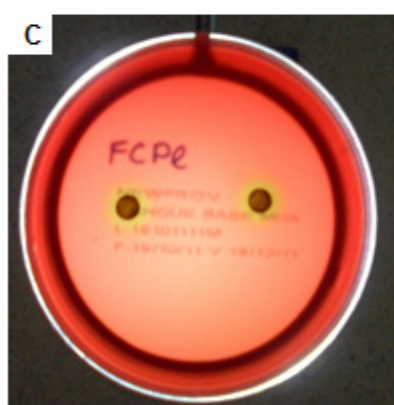
FIGURA 22 – PLACAS DE ÁGAR SANGUE COM AMOSTRAS DE *P. alopecuroides* DC.
FONTE: O autor, 2009.



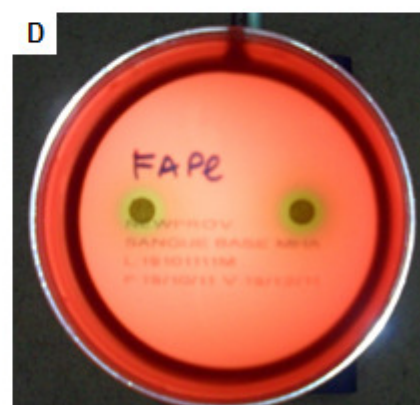
Extrato Bruto
P. lorentzii



Fração Hexano
P. lorentzii



Fração Clorofórmio
P. lorentzii



Fração Acetato de Etila
P. lorentzii

FIGURA 23 – PLACAS DE ÁGAR SANGUE COM AMOSTRAS DE *P. lorentzii* Malme
FONTE: O autor, 2009.



5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina

FIGURA 24 – PLACAS DE ÁGAR SANGUE COM CUMARINA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA
FONTE: O autor, 2009

As manchas ao redor dos discos de papel escurecidos observados nas figuras 22 e 23 foram causadas pela difusão das amostras no meio. Observa-se que o meio permanece com sua opacidade característica diferentemente do halo de hemólise visto no controle positivo (FIGURA 21-A). No segundo disco da placa Fração Acetato de Etila (FIGURA 22-D) houve crescimento de um fungo o que provocou um pequeno e irregular halo de hemólise e que foi desconsiderado neste ensaio. Sendo assim, pode-se dizer que as amostras testadas não apresentam atividade hemolítica.

Estudo realizado por Kaneko, Baba e Matsuo (2003) demonstrou que o grupamento *orto* catecol das cumarinas é um fator determinante na proteção contra citotoxicidade induzida por hidroperóxidos de ácido linoleico em células endoteliais venosas de cordão umbilical humano em cultura. Além disso, foi observado que o grupo hidroxila do núcleo cumarínico do xantotoxol era o principal responsável pela inibição da hemólise em eritrócitos de ratos e pela inibição da peroxidação de lipídeos (NG *et al.*, 2000).

A não toxicidade dos extratos e frações de *P. lorentzii* e *P. alopecuroides* assim como da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina neste ensaio não condiz com a literatura à respeito da toxicidade das cumarinas. Entretanto a atividade das cumarinas é sítio dependente o que sugere neste caso que as substituições no anel cumarínico da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxicumarina não tem ação sobre os eritrócitos e ou no mecanismo de rompimento das hemácias.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.4.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

O resultado deste ensaio com o extrato e as frações de *P. alopecuroides* (EB, FH, FC, FA) pode ser visualizado nos Gráficos 1 e 2.

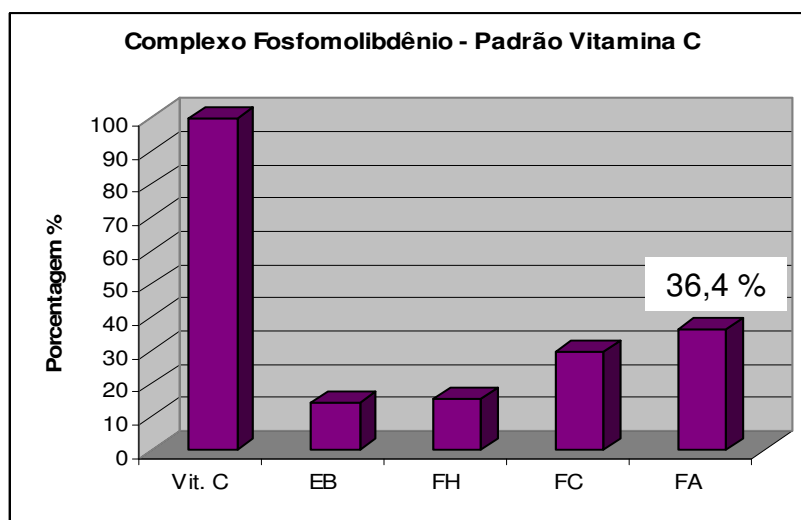


GRÁFICO 1 – TAXA DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO À VITAMINA C DAS AMOSTRAS DE *P. alopecuroides* DC.

LEGENDA: Vit.C – Vitamina C; EB – extrato bruto; FH – fração hexano; FC – fração clorofórmio; FA – fração acetato de etila

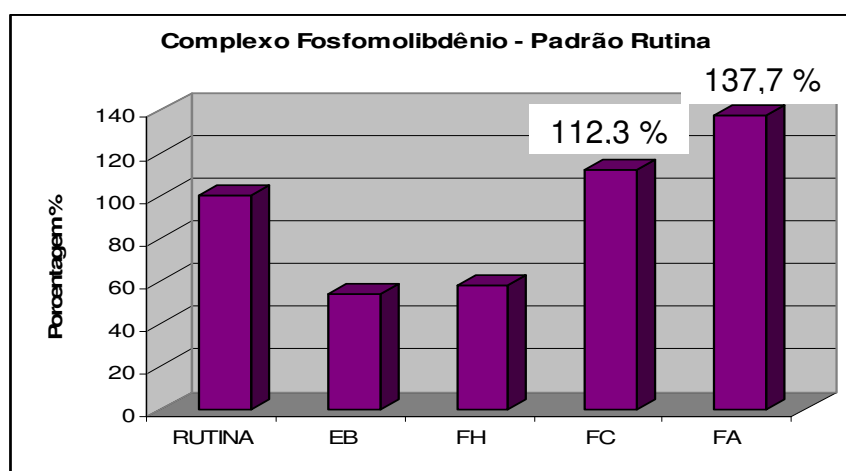


GRÁFICO 2 – TAXA DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO À RUTINA DAS AMOSTRAS DE *P. alopecuroides* DC.

LEGENDA: EB – extrato bruto; FH – fração hexano; FC – fração clorofórmio; FA – fração acetato de etila

Em relação à Vitamina C, as amostras apresentaram atividade pouco significativa, não chegando a 50% da atividade de referência. A amostra com maior expressão foi a fração acetato de etila (FA) com 36,4% de atividade.

Já na comparação com a Rutina as amostras apresentam grande atividade, as frações clorofórmio (FC) e acetato de etila (FA), mostraram-se mais reativas que a própria referência, com AAR% de 112,3% e 137,7% respectivamente.

Já os dados obtidos no ensaio com o extrato bruto, frações hexano, clorofórmio e acetato de etila de *P. lorentzii* além da cumarina isolada podem ser observados no Gráfico 3:

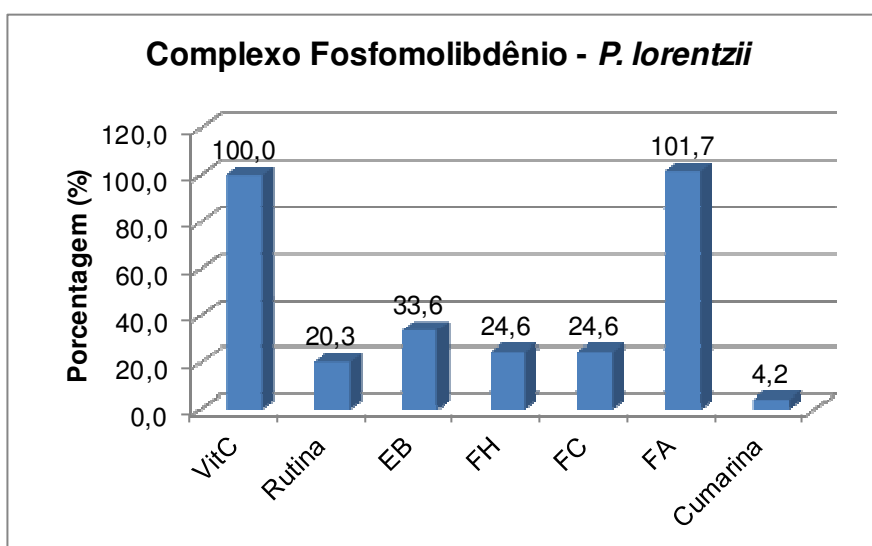


GRÁFICO 3 - TAXA DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO AOS CONTROLES VITAMINA C E RUTINA DAS AMOSTRAS DE *P. lorentzii* Malme

LEGENDA: VitC – vitamina C; EB – extrato bruto; FH – fração hexano; FC – fração clorofórmio; FA – fração acetato de etila; Cumarina - 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina

Pode se observar que a fração acetato de etila (FA) de *P.lorentzii* também apresenta grande atividade antioxidante em relação às demais amostras equiparando-se à atividade do padrão Vitamina C indicando a presença de metabólitos secundários com atividade antioxidante. Já a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina não apresentou resultado significativo, sua atividade foi a mais baixa das amostras testadas e inferior ao

padrão rotina. As demais frações (EB, FH e FC) da mesma forma como para as amostras (EB, FH e FC) de *P. alopecuroides* não demonstraram significância nesta atividade testada. Neste ensaio também observa-se a baixa atividade do padrão rotina em relação ao padrão vitamina C apresentando apenas cerca de 20% de atividade.

A atividade antioxidante em compostos cumarínicos é conhecida e é atribuída à sua presença em extratos vegetais à capacidade de inibir reativos de oxigênio. Como é o caso das cumarinas escopoletina e cleomiscosina A isoladas de *Weigela subsessilis* (Caprifoliaceae) que apresentaram atividade antioxidante, inibindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em experimento, induzidas por íons cobre e pelo composto AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorida) (THUONG *et al.*, 2005).

Estudos envolvendo a cumarina (1,2-benzopirona) e alguns de seus derivados substituídos (7-hidroxycumarina, 7-acetoxicumarina e 7-aliloxicumarina) em atividades antioxidantes no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho mostraram que a 1,2-benzopirano não tinha efeito sobre a produção de radicais superóxido. Entretanto, seus derivados substituídos apresentaram capacidade inibitória dose-dependente dos radicais superóxido o que levou a concluir que a substituição do anel benzopirona na posição 7 é responsável pela atividade antioxidante (MONTAGNER, 2007). De fato, as substituições podem ocorrer em qualquer uma das 6 posições disponíveis na estrutura básica das cumarinas, o que atribui a elas grande diversidade estrutural (BEILLEROT *et al.*, 2008).

A substituição do anel cumarínico da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina pode estar diretamente relacionada à baixa atividade antioxidante observada neste ensaio. No entanto, as frações clorofórmio e acetato de etila de ambas as espécies de *Pterocaulon* testadas apresentaram considerável capacidade inibitória do radical DPPH. Neste caso ainda, a presença de compostos fenólicos e flavonoides nas frações acetato de etila nos testes preliminares justificaram a atividade antioxidante observada.

5.4.2 Redução do Radical DPPH

5.4.2.1 DPPH Qualitativo

Este ensaio permite visualizar a capacidade de reação do radical estável DPPH com a amostra submetida à cromatografia em camada delgada. Na cromatoplaca (FIGURA 25), pode-se observar as manchas amarelas no fundo lilás indicativo de reação positiva.

As amostras testadas foram EB, FH, FC e FA derivadas do extrato de *P. alopecuroides* nas indicações de 1 a 4, as mesmas amostras de *P. lorentzii* nas indicações de 5 a 8, a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina na posição 9 e o padrão rutina na posição 10 da cromatoplaca. Observa-se que nos pontos referentes aos extratos brutos e às frações hexânicas há baixa reação com o radical DPPH indicando baixa concentração de compostos fenólicos. Já nos pontos 3, 4, 7 e 8 há intensa formação de manchas amarelas, indicando alta concentração de compostos com capacidade antioxidante. No ponto referente à 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina não se observa reação significativa quando comparada com o padrão rutina no ponto 10.

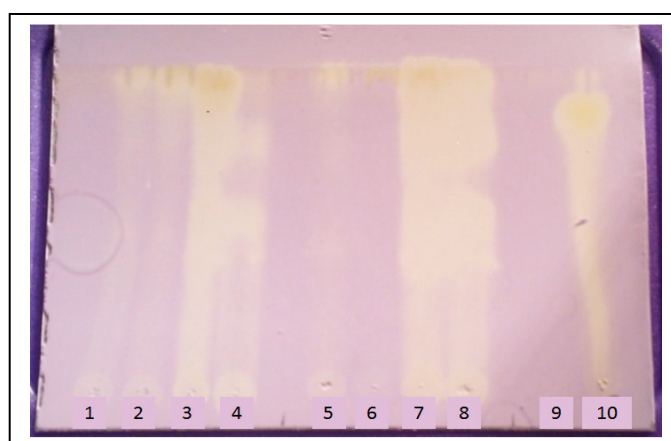


FIGURA 25 – CCD ILUSTRATIVA DE DPPH QUALITATIVO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *P. alopecuroides* E *P. lorentzii*, DA 5-(2,3-DIHIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA E DO PADRÃO RUTINA

LEGENDA: 1 – EBP_a; 2 – FHP_a; 3 – FCP_a; 4 – FAP_a; 5 – EBP_I; 6 – FHP_I; 7 – FCP_I; 8 – FAP_I; 9 - 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina; 10 – padrão rutina

FONTE: O autor, 2013.

5.4.2.2 DPPH Quantitativo

As amostras EB, FH, FC, e FA de *P. alopecuroides* e de *P. lorentzii* submetidas ao ensaio tiveram a taxa de inibição do DPPH calculada por regressão linear, obtendo EC_{50} , ou seja, a concentração de amostra capaz de reduzir 50% da concentração inicial de DPPH. Cada amostra foi comparada com os padrões de vitamina C e rutina.

Os Gráficos 4 e 5 mostram as equações de reta para o padrões de Vitamina C e Rutina, nos Gráficos 6 a 8 estão representados os resultados para as amostra de *P. alopecuroides* e de 9 a 11, os resultados para as amostras de *P. lorentzii*.

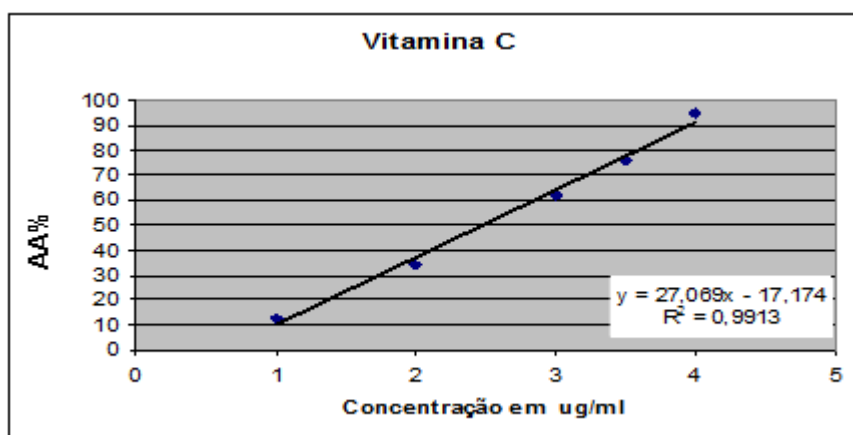


GRÁFICO 4 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA VITAMINA C OBTIDA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

LEGENDA: y - equação da reta; R^2 – coeficiente de determinação

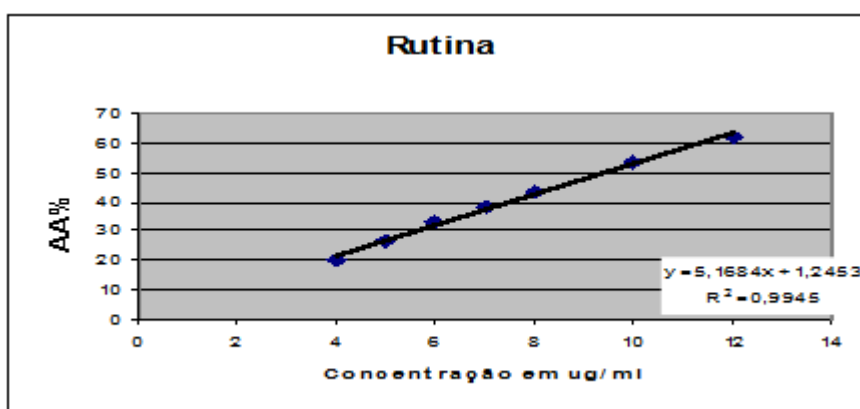


GRÁFICO 5 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA RUTINA OBTIDA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

LEGENDA: y - equação da reta; R^2 – coeficiente de determinação

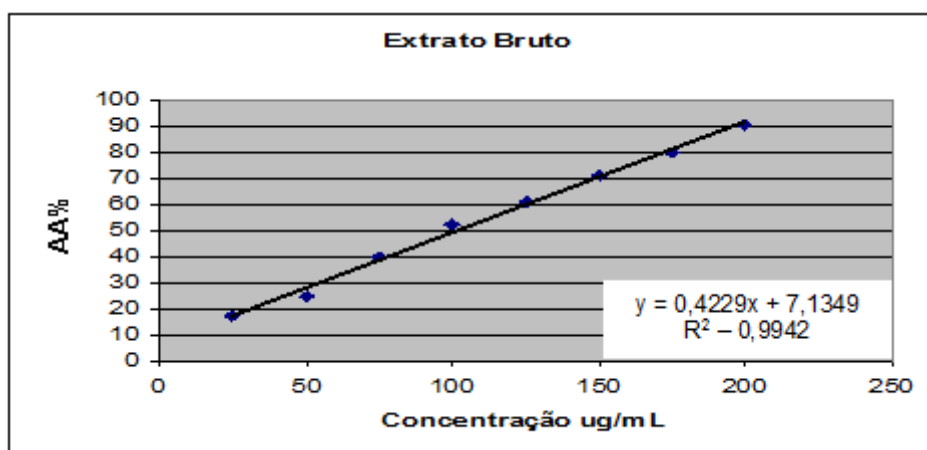


GRÁFICO 6 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *P. alopecuroides* OBTIDA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH
 LEGENDA: y - equação da reta; R^2 – coeficiente de determinação

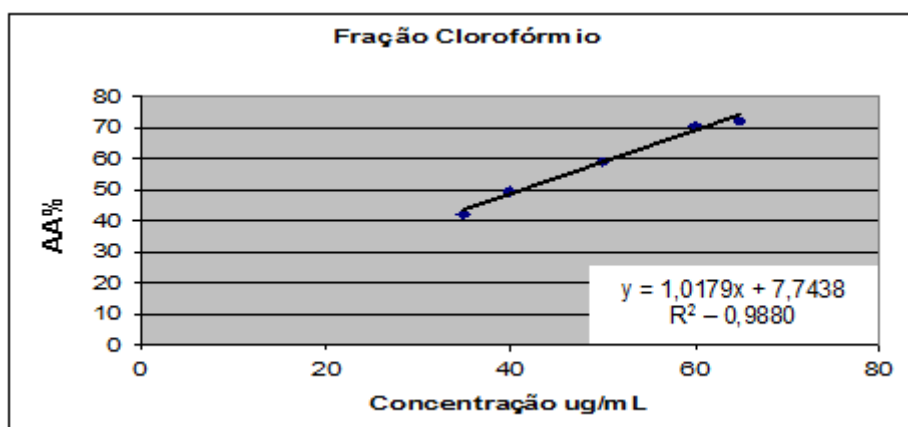


GRÁFICO 7 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DE *P. alopecuroides* OBTIDA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH
 LEGENDA: y - equação da reta; R^2 – coeficiente de determinação

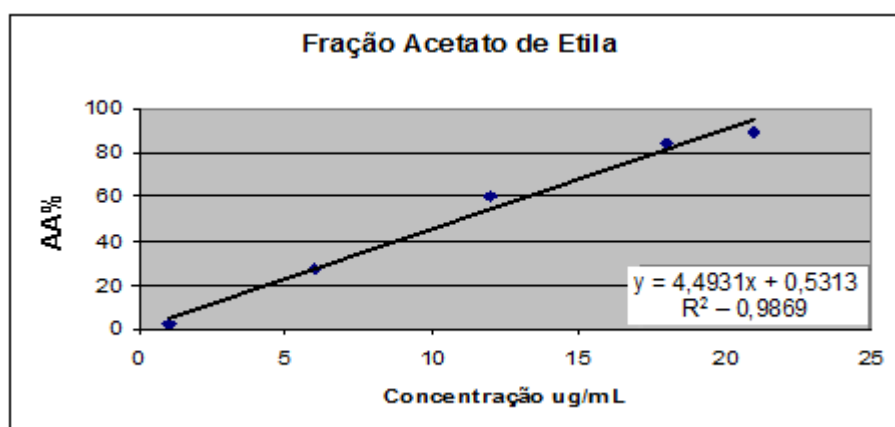


GRÁFICO 8 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *P. alopecuroides* OBTIDA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH
 LEGENDA: y - equação da reta; R^2 – coeficiente de determinação

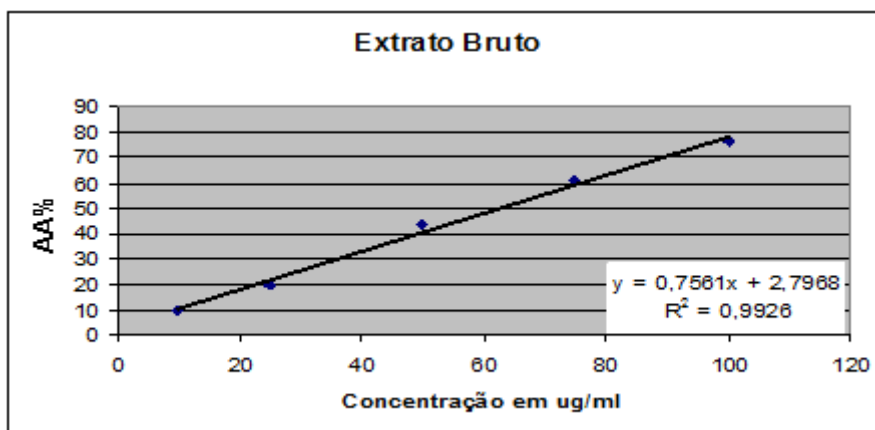


GRÁFICO 9 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *P. lorentzii* OBTIDA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

LEGENDA: y - equação da reta; R^2 – coeficiente de determinação

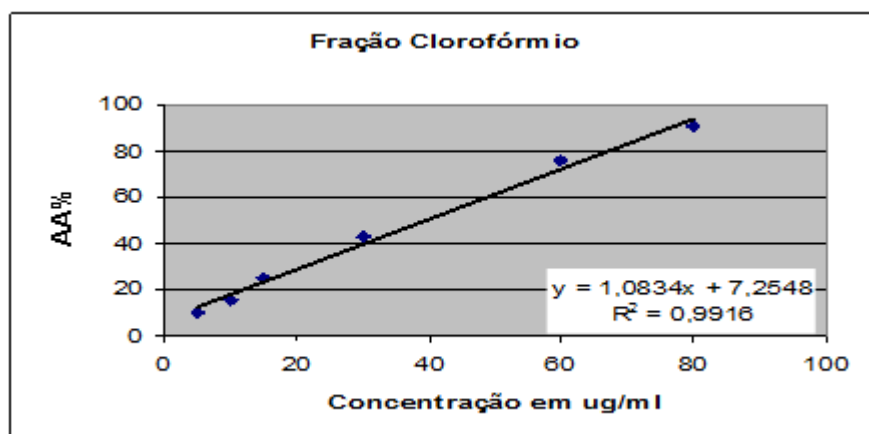


GRÁFICO 10 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DE *P. lorentzii* OBTIDA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

LEGENDA: y - equação da reta; R^2 – coeficiente de determinação

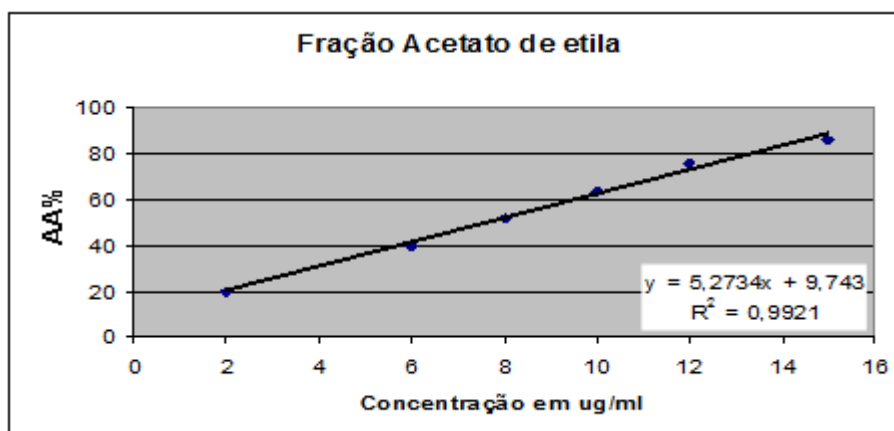


GRÁFICO 11 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *P. lorentzii* OBTIDA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

LEGENDA: y - equação da reta; R^2 – coeficiente de determinação

Os resultados de EC_{50} apresentados na Tabela 3 correspondem às médias das triplicatas \pm desvio padrão. A diferença estatística entre as amostras foi verificada aplicando-se Anova, e para localização das diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$).

TABELA 3 – RESULTADO DE EC_{50} E TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH DAS AMOSTRAS DE *Pterocaulon alopecuroides* E *Pterocaulon lorentzii*

Amostra		Valores de EC_{50} em $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$	Classificação segundo Teste de Tukey ($p < 0,05$)
VITAMINA C		$2,48 \pm 0,0680$	a1
RUTINA		$9,43 \pm 0,0769$	a2
<i>P. alopecuroides</i>	EB	$101,36 \pm 1,6941$	a5
	FH	$198,91 \pm 1,8801$	a5
	FC	$41,51 \pm 0,6446$	a3
	FA	$10,74 \pm 0,5445$	a2
<i>P. lorentzii</i>	EB	$62,43 \pm 3,2449$	a4
	FH	$386,79 \pm 1,8281$	a5
	FC	$39,45 \pm 1,4416$	a3
	FA	$7,63 \pm 0,1279$	a2

Legenda: DP – Desvio Padrão; BHT – Butil-hidroxi-tolueno; EB – extrato bruto; FH – fração hexano; FC – fração clorofórmio; FA – Fração acetato de etila

A análise evidencia que as amostras testadas comportam-se de maneira semelhante entre as espécies de *Pterocaulon*. As frações acetato de etila (FA) apresentaram classificação estatisticamente igual ao do padrão rutina. As frações clorofórmio (FC) classificaram-se um nível abaixo ao da rutina e as frações hexano (FH), três níveis abaixo. Já os extratos brutos tiveram comportamento distinto, sendo o extrato bruto (EB) de *P. lorentzii* mais ativo que o EB de *P. alopecuroides*.

A resposta ao ensaio das frações FA das espécies chama a atenção pelo fato de apresentarem EC_{50} muito próxima ou menor ao do próprio padrão rutina. A maior atividade antioxidante apresentada pelas frações acetato de

etila nos dois ensaios, formação do complexo fosfomolibdênio e reação com o radical DPPH, pode ser atribuída a compostos fenólicos presentes nesta fração em maior concentração do que nas demais frações como por exemplo a quercetina já observado nesta fração por Sasaki (2008) e outros flavonoides como (2S)-5,40-Dihidroxi-7-(2-hidroxi-3-metil-3-buteniloxi)flavanona, (2R,3R)-5,40-Dihidroxi-7-(2-hidroxi-3-metil-3-buteniloxi)dihidroflavonol e 5,30,40-trihidroxi-7-(g,g-dimetilaliloxi)flavonol recentemente isolados de *P. alopecuroides* por Alarcón *et al.* (2010). Outros vários flavonoides já foram descritos para o gênero *Pterocaulon* compreendendo flavonóis (DEBENEDETTI *et al.*, 1987, 1994; SEMPLE *et al.*, 1999; KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2003; HEEMANN *et al.*, 2006), flavanonas (ALARCÓN *et al.*, 2008; MACLEOD E RASMUSSEN, 1999), e dihidroflavonóis (ALARCÓN *et al.*, 2008; BOHLMANN *et al.*, 1981; HEEMANN *et al.*, 2006; VILEGAS *et al.*, 1995). Por estes dados torna-se importante a pesquisa de atividade antioxidante por outros métodos para se observar a repetição deste comportamento, considerando o grande interesse farmacológico e econômico de substâncias com este potencial.

5.4.3 Teste de atividade antioxidante pelo método de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de reação ao ácido tiobarbitúrico está demonstrada na Tabela 4 em que a atividade é classificada segundo o teste de Tukey em a1, a2, a3, a4, a5, a6 e a7.

TABELA 4 – RESULTADO DA CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO O TESTE DE TUKEY PARA A REAÇÃO AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO DAS AMOSTRAS DE *Pterocaulon alopecuroides* E *Pterocaulon lorentzii*

Amostra		Valores de IA% \pm DP	Classificação segundo Teste de Tukey ($p < 0,05$)	
Controle positivo (BHT)		0,169 \pm 0,0087	a1	
Controle negativo		0,502 \pm 0,0143		a7
Cumarina isolada		0,462 \pm 0,0183		a6 a7
<i>P. alopecuroides</i>	EB	0,419 \pm 0,0517	a1	a2
	FH	0,268 \pm 0,0135		a5
	FC	0,258 \pm 0,0118		a3 a4
	FA	0,327 \pm 0,0134		a3
<i>P. lorentzii</i>	EB	0,213 \pm 0,0094	a1	a2
	FH	0,356 \pm 0,0229		a3
	FC	0,284 \pm 0,0107		a3
	FA	0,272 \pm 0,0107	a2	a3

Legenda: IA% - índice antioxidante; DP – Desvio Padrão; BHT – Butil-hidrox-tolueno; EB – extrato bruto; FH – fração hexano; FC – fração clorofórmio; FA – Fração acetato de etila

Pode se observar que as amostras de *P. alopecuroides* e *P. lorentzii* apresentam atividade antioxidante não significativa neste ensaio. Em comparação com o controle positivo (BHT) apenas o extrato bruto de ambas as espécies apresenta atividade similar demonstrada pela mesma classificação (a1). As demais amostras avaliadas apresentaram reduzida atividade antioxidante, como a fração clorofórmio (FC) e fração acetato de etila (FA) de *P. alopecuroides* e fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), e fração acetato de etila (FA) de *P. lorentzii*. Já a fração hexano (FH) de *P. alopecuroides* apresenta a menor atividade dentre as frações testadas em relação ao controle positivo. E a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina recebeu classificação similar à do controle negativo, ou seja, não apresenta atividade antioxidante neste ensaio.

A dupla classificação em algumas amostras se deve ao fato do teste fazer comparações das amostras com os controles e das amostras entre si.

Como a atividade antioxidante é avaliada em relação ao controle positivo (BHT), consideramos amostra ativa, ou seja, que apresenta atividade antioxidante neste ensaio, apenas aquela que obtiver a mesma classificação a1 apresentada pelo controle positivo e neste caso são os extratos brutos de *P. alopecuroides* e de *P. lorentzii*. As demais amostras apesar de se diferenciarem do controle negativo, não foram consideradas ativas.

Pode se observar que nas três metodologias utilizadas para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos, frações e da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina foram obtidos resultados distintos para uma mesma amostra. Este comportamento pode ser atribuído ao fato de que não há, até o momento, um método simples e universal que meça precisa e quantitativamente a capacidade antioxidante de uma substância ou de um extrato. Os diferentes tipos de radicais livres e as diferentes formas de atuação nos organismos vivos, assim como os interferentes em cada metodologia e os diferentes mecanismos de reação, tornam necessário o emprego de diversas técnicas para avaliação do potencial antioxidante de uma mesma substância ou extrato.

5.5 EFICÁCIA DOS EXTRATOS, SUAS FRAÇÕES E DA 5-(2,3-DIHDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA DE *P. alopecuroides* E *P. lorentzii* NA INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS OVOS DE NEMATÓIDES DE OVINOS E NO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR

Os testes *in vitro* comparados aos testes *in vivo* são comumente menos dispendiosos e permitem a incubação de parasitas em seus diversos estágios de desenvolvimento com uma vasta gama de substâncias e extratos vegetais. Além disso, testes *in vitro* são facilmente executáveis e demandam uma quantidade pequena de material biológico (DEMELER *et al.*, 2013; GITHIORI *et al.*, 2006).

5.5.1 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)

O ensaio de TEO avaliou o potencial de extratos e substâncias no embrionamento e eclodibilidade de ovos de nematoides (MOLENTO e PRICHARD, 2001; D'ASSONVILLE *et al.*, 1996).

O teste de eclodibilidade de ovos de nematoides foi considerado válido para eclodibilidade maior que 90% no controle negativo. Como controle positivo foi utilizado Albendazol 25 µg/mL que atingiu 100% de inibição do desenvolvimento dos ovos.

Assim, pode-se observar nos Gráficos 12 e 13 a eficácia *in vitro* das amostras extrato bruto (EBPa), fração hexano (FHPa), fração clorofórmio (FCPa) e fração acetato de etila (FAPa) de *P. alopecuroides* DC. e a eficácia *in vitro* das amostras extrato bruto (EBPI), fração hexano (FHPI), fração clorofórmio (FCPI) e fração acetato de etila (FAPI) de *P. lorentzii* Malme respectivamente. Já o Gráfico 14 mostra a eficácia da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina na inibição do desenvolvimento de ovos de nematoides.

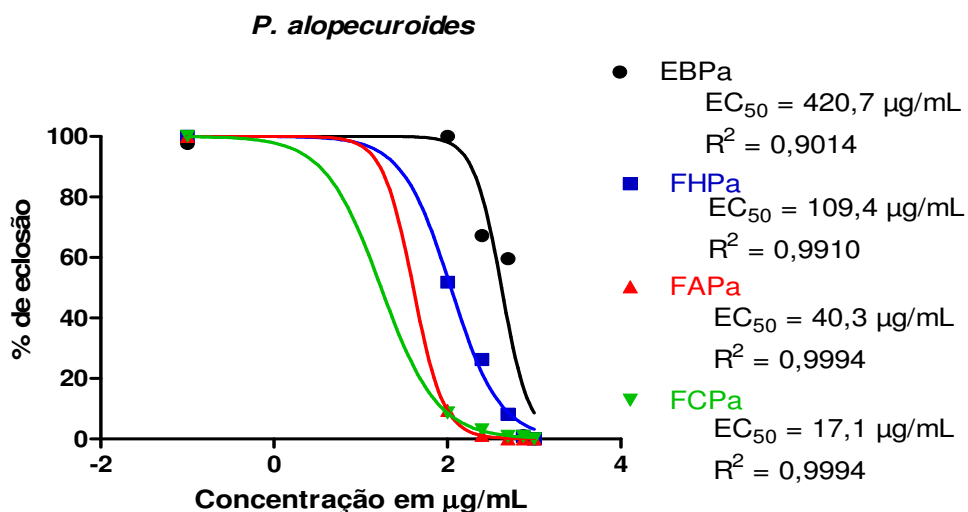


GRÁFICO 12 – EFICÁCIA DAS AMOSTRAS DE *P. alopecuroides* DC. NA ECLODIBILIDADE DE OVOS DE NEMATOIDES DE OVINOS

LEGENDA: EBPa – extrato bruto de *P. alopecuroides*; FHPa – fração hexano de *P. alopecuroides*; FCPa – fração clorofórmio de *P. alopecuroides*; FAPa – fração acetato de etila de *P. alopecuroides*; EC₅₀ – concentração efetiva 50%; R² – coeficiente de determinação

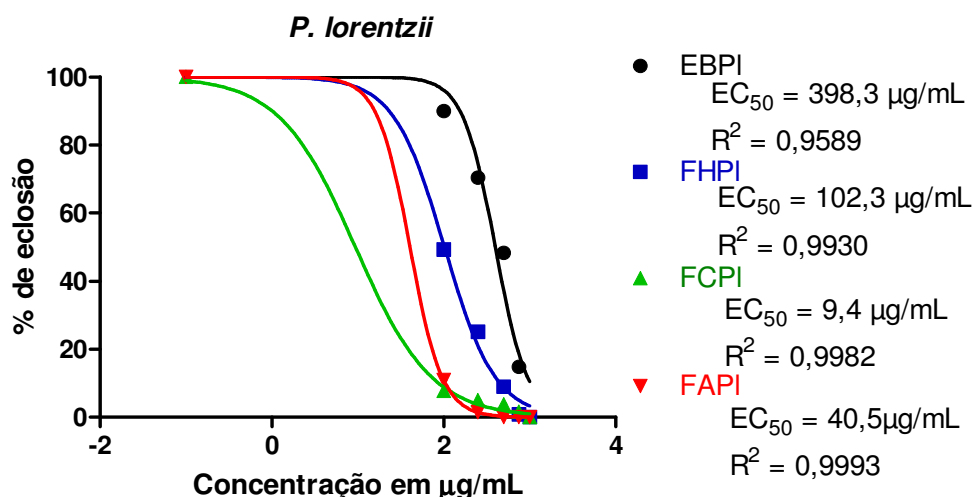


GRÁFICO 13 – EFICÁCIA DAS AMOSTRAS DE *P. lorentzii* Malme NA ECLODIBILIDADE DE OVOS DE NEMATOIDES DE OVINOS

LEGENDA: EBPI – extrato bruto de *P. lorentzii*; FHPI – fração hexano de *P. lorentzii*; FCPI – fração clorofórmio de *P. lorentzii*; FAPI – fração acetato de etila de *P. lorentzii*; EC₅₀ – concentração efetiva 50%; R² – coeficiente de determinação

5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina

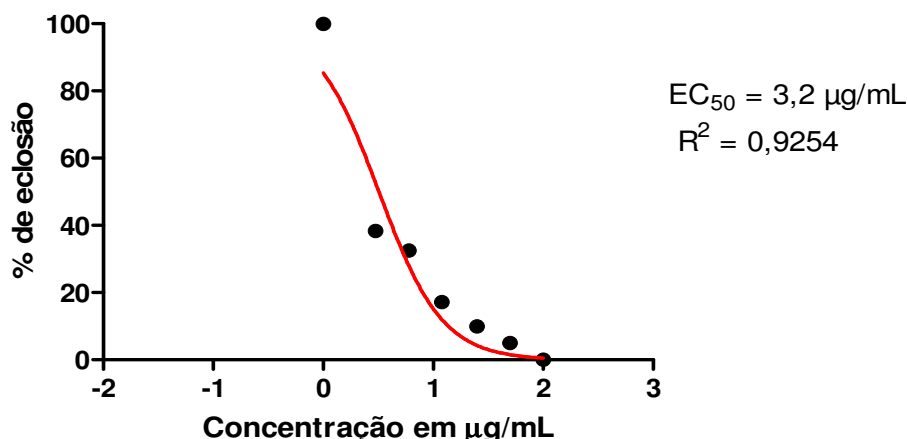


GRÁFICO 14 – EFICÁCIA DA 5-(2,3-DIHIIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA NA ECLODIBILIDADE DE OVOS DE NEMATOIDES DE OVINOS

Nestes dados observa-se que em ambas as espécies, as frações clorofórmio (FCPa e FCPI) apresentaram maior eficácia na inibição do desenvolvimento dos ovos e consequentemente na sua eclosão. Pode-se observar que a EC₅₀ de FCPa corresponde a 17,2 µg/mL enquanto que para FCPI o valor é de 9,4 µg/mL, ou seja a fração clorofórmica de *P. lorentzii* apresentou atividade mais significativa que aquela obtida da mesma fração de *P. alopecuroides*. Uma possível justificativa para este fato é a maior

concentração da cumarina isolada a partir de *P. lorentzii* do que de *P. alopecuroides*.

Nas demais amostras testadas de *P. alopecuroides* pode se observar uma escala crescente de atividade. Após FCPa, a fração acetato de etila (FAPa) apresentou maior atividade com EC₅₀ de 40,3 µg/mL, seguido pela fração hexânica com EC₅₀ de 109,4 µg/mL e extrato bruto com EC₅₀ de 420,7 µg/mL.

Da mesma maneira as amostras de *P. lorentzii* apresentaram as seguintes concentrações de EC₅₀: FAPI EC₅₀ de 40,5 µg/mL, FHPI EC₅₀ de 102,3 µg/mL, EBPI EC₅₀ de 398,3 µg/mL.

Já o Gráfico 14 apresenta os dados da eficácia da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina. Pode-se observar que sua EC₅₀ é de 3,2 µg/mL, o que justifica a maior atividade das frações clorofórmicas de ambas as espécies uma vez que esta cumarina tenha sido isolada destas frações.

Algumas cumarinas apresentam atividade antiparasitária como a 5,7-dimetoxi-8-(3'-hidroxi-3'-metil-1'-buteno)cumarina isolada de *Toddalia asiática* (OKETCH-RABAH *et al.*, 2000) e 7,8-di-hidroxycumarina (dafnetina) (WANG, *et al.*, 2002) que apresentaram atividade antimalárica. A cumarina 4-(1-metilpropil)-5,7-di-hidroxi-8-(4-hidroxi-3-metilbutiril)-6-(3-metilbut-2-enil)cromen-2-ona isolada de *Kielmeyera albopunctata* (SCIO, *et al.*, 2003) e o psoraleno (VAN VOORHIS, *et al.*, 2003) apresentaram atividade contra formas do *Trypanosoma cruzi*.

Botura *et al.* (2013) observaram atividade ovicida em extratos e frações de *Agave sisalana*, entre eles a fração de flavonóides apresentou EC₅₀ 50µg/mL e o extrato acetato de etila EC₅₀ 100 µg/mL. Batista *et al.* (1999) testaram extratos aquosos de *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* e observaram atividade sobre os ovos de *Haemonchus contortus* com EC₅₀ 170 µg/mL e EC₅₀ 100 µg/mL, respectivamente.

Em comparação com estes dados da literatura pode se dizer que os extratos e frações de *P. alopecuroides* e *P. lorentzii* e a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina têm um potencial anti-helmíntico muito importante principalmente nas frações clorofórmio que apresentaram concentrações efetivas menores do que aqueles descritos na literatura para plantas medicinais.

5.5.2 Teste de migração larval em ágar (TMLA)

O ensaio de TMLA avaliou o potencial dos extratos, das frações e da cumarina isolada sobre a motilidade de larvas de helmintos (DEMELETER *et al.*, 2013; MOLENTO e PRICHARD, 2001; D'ASSONVILLE *et al.*, 1996).

Em ambas as espécies de *Pterocaulon* estudadas, as diferentes amostras revelaram comportamento semelhante na inibição de migração das larvas. Entretanto, é observada uma maior atividade nas amostras de *P. lorentzii* Malme. Os Gráficos 15 e 16 mostram o comportamento das amostras assim como suas EC_{50} .

Para este ensaio foram utilizadas as concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Como controle negativo foi utilizado uma solução de metanol a 2,5% que foi usado para dissolver as amostras. A eficácia do controle positivo ivermectina pode ser observada no Gráfico 17 e a eficácia na inibição da migração larval da 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina está expressa no Gráfico 18.

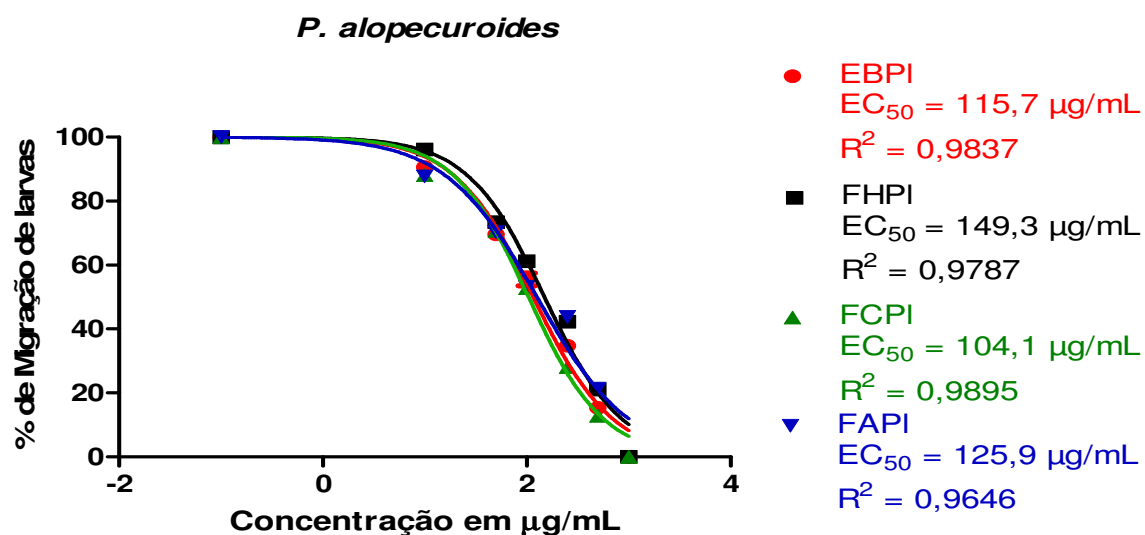


GRÁFICO 15 – EFICÁCIA DAS AMOSTRAS DE *P. alopecuroides* DC. NA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE NEMATOIDES DE OVINOS EM ÁGAR

LEGENDA: EBPa – extrato bruto de *P. alopecuroides*; FHPa – fração hexano de *P. alopecuroides*; FCPa – fração clorofórmio de *P. alopecuroides*; FAPa – fração acetato de etila de *P. alopecuroides*; EC_{50} – concentração efetiva 50%; R^2 – coeficiente de determinação

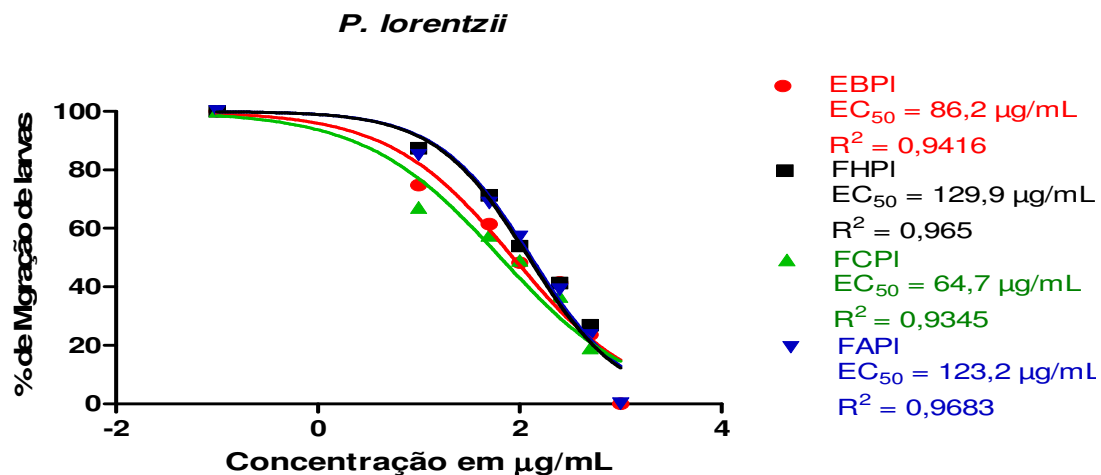


GRÁFICO 16 – EFICÁCIA DAS AMOSTRAS DE *P. lorentzii* Malme NA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE NEMATOIDES DE OVINOS EM ÁGAR
 LEGENDA: EBPI – extrato bruto de *P. lorentzii*; FHPI – fração hexano de *P. lorentzii*; FCPI – fração clorofórmio de *P. lorentzii*; FAPI – fração acetato de etila de *P. lorentzii*; EC_{50} – concentração efetiva 50%; R^2 – coeficiente de determinação

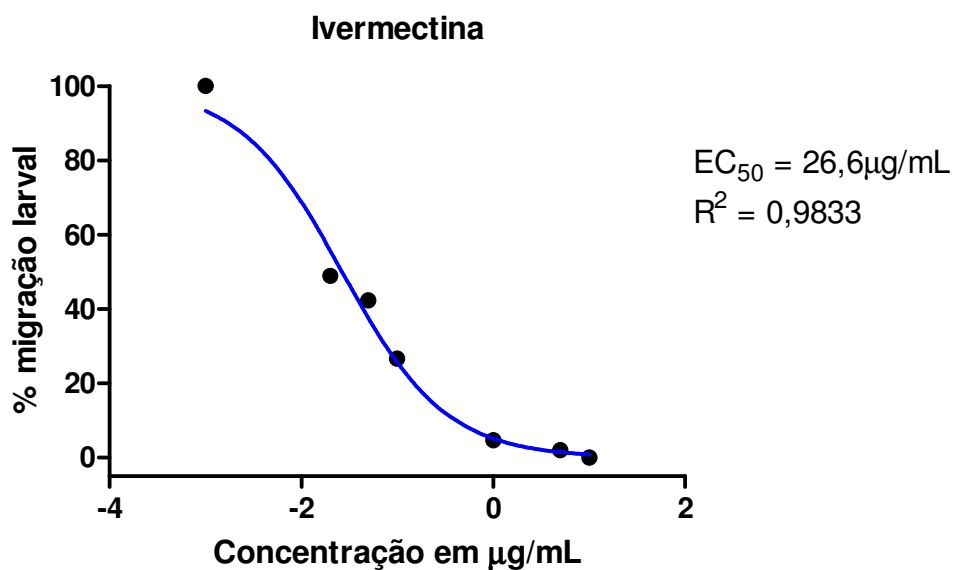


GRÁFICO 17 – EFICÁCIA DO CONTROLE POSITIVO IVERMECTINA NA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE NEMATOIDES DE OVINOS EM ÁGAR
 LEGENDA: EC_{50} – concentração efetiva 50%; R^2 – coeficiente de determinação

5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina

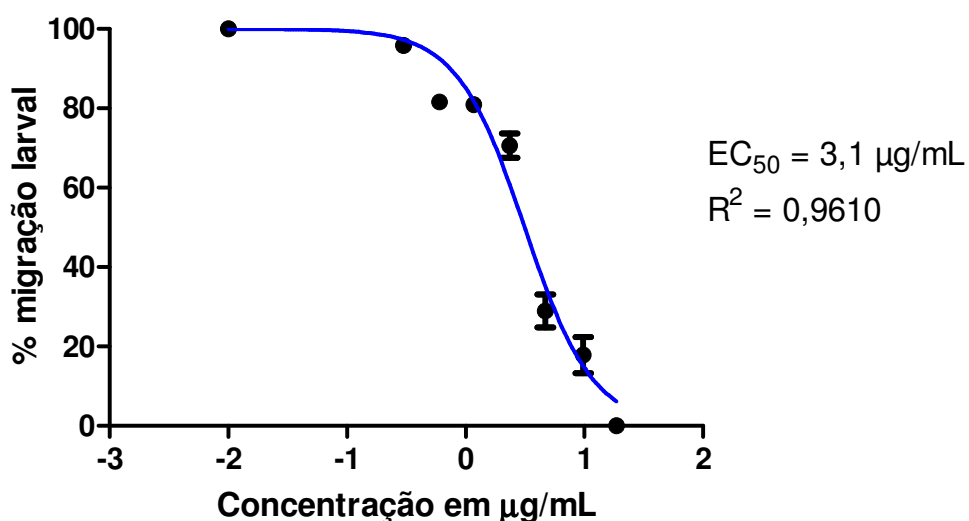


GRÁFICO 18 – EFICÁCIA DA CUMARINA 5-(2,3-DIHIIDROXI-3-METILBUTILOXI)-6,7-METILENEDIOXICUMARINA NA MIGRAÇÃO DE LARVAS DE NEMATOIDES DE OVINOS EM ÁGAR

LEGENDA: EC_{50} – concentração efetiva 50%; R^2 – coeficiente de determinação

Na Tabela 5 pode se observar os valores de EC_{50} no TMLA para as amostras testadas de *P. lorentzii* e *P. alopecuroides* assim como para a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina e o controle positivo ivermectina.

TABELA 5 – RESULTADO DE EC_{50} PARA INIBIÇÃO DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR DAS AMOSTRAS DE *P. alopecuroides* E *P. lorentzii*

Amostras	<i>P. alopecuroides</i>		<i>P. lorentzii</i>	
	EC_{50} (µg/mL)	R^2	EC_{50} (µg/mL)	R^2
Extrato Bruto (EB)	115,7	0,9837	86,2	0,9416
Fração Hexano (FH)	149,3	0,9787	129,9	0,9654
Fração Clorofórmio (FC)	104,1	0,9895	64,72	0,9345
Fração acetato de Etila (FA)	125,9	0,9646	123,2	0,9683
Cumarina ^a	3,1	0,9610		
Ivermectina ^b	26,6	0,9833		

Legenda: ^a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina; EC_{50} – concentração efetiva 50%; R^2 – coeficiente de determinação

^b Controle positivo

Assim, observamos que as Frações Clorofórmio apresentaram o menor valor de EC₅₀ para inibir a migração das larvas de nematoides em ágar. Ou seja, sua composição apresenta ativos com maior eficácia antiparasitária que as demais frações e extratos. Mais uma vez atribuímos esta atividade à maior concentração da cumarina 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina encontrada nesta fração. Outro dado importante a ser notado, é que FC de *P. lorentzii* é 60,8% mais eficaz que a mesma fração de *P. alopecuroides* e 33,25% mais ativo que seu extrato bruto.

Considerando que a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina obteve maior expressão neste ensaio e que a inibição da migração larval está diretamente ligada à atividade muscular do parasita, é interessante relacionar estes fatos com a ação que a cumarina pode exercer sobre a enzima acetil-colinesterase (AChE), responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A AChE está presente no sistema nervoso central e periférico. No sistema nervoso periférico ela é responsável pela modulação dos impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos, pela dilatação dos vasos sanguíneos e pela contração dos músculos lisos, enquanto que no sistema nervoso central ela está envolvida no controle motor, na cognição e na memória (RANG, 2001). Kang (2001) e colaboradores observaram que o extrato metanólico das raízes de *Angelica gigas* inibe eficazmente a atividade da AChE. Deste extrato foram isoladas 12 cumarinas, entre elas a dihidropiranocumarina (decursinol), composto majoritário que demonstrou ter maior potencial inibitório da AChE. Desta forma, a atividade positiva das frações de *P. lorentzii* e *P. alopecuroides*, na inibição da migração de larvas neste ensaio sugere que a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina possa ter seu mecanismo de ação baseado na inibição da AChE.

Botura *et al.* (2013) observaram que a fração de saponinas extraída de *Agave sisalana* apresentou uma concentração efetiva de 2,5mg/mL no teste de inibição de migração de larvas, concentração menos expressiva do que aquelas apresentadas pelas amostras das espécies *P. alopecuroides* e *P. lorentzii*.

A EC_{50} de apenas 3,1 $\mu\text{g/mL}$ apresentada neste ensaio pela 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxy)-6,7-metilenedioxycumarina justifica a eficácia da fração clorofórmio neste ensaio. Entende-se aqui que a pouca quantidade deste composto para se atingir o efeito esperado, ou seja a concentração efetiva em relação ao padrão, faz desta substância um grande potencial terapêutico no controle de endoparasitoses em ruminantes acometidos por nematoides tais como o *Haemonchus contortus*.

A pesquisa de espécies vegetais faz parte de uma cadeia de etapas de imensa importância para a utilização correta de plantas medicinais como alternativa para o controle de verminoses. Deste modo, testes *in vitro* e *in vivo* com os extratos, as frações e a 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxy)-6,7-metilenedioxycumarina de *P. lorentzii* e *P. alopecuroides* permitiu avaliar a existência de propriedades anti-helmínticas oportunizando o desenvolvimento de formas farmacêuticas eficientes como alternativa fitoterápica para o combate as endoparasitoses e à resistência helmíntica aos fármacos disponíveis no mercado de hoje.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- A substância 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina foi isolada a partir da fração clorofórmio de ambas espécies *P. lorentzii* (1,433g) e *P. alopecuroides* (70,7mg) por cromatografia líquida em coluna e identificada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
- Na avaliação da toxicidade frente ao microcústaceo *Artemia salina* os extratos, frações e cumarina isolada não apresentaram toxicidade neste ensaio;
- Na avaliação da atividade hemolítica as amostras testadas de *P. lorentzii* e *P. alopecuroides* apresentaram atividade relevante apenas no ensaio com sangue de carneiro nas concentrações acima de 500 µg/mL. No ensaio realizado em ágar sangue não houve resultado positivo para a atividade hemolítica. Sendo assim sugere-se a aplicação de um novo ensaio para avaliação mais precisa desta atividade para então concluir a capacidade de provocar hemólise das amostras (extratos, frações e cumarina isolada) das espécies em estudo;
- Na avaliação da atividade antioxidante no ensaio de formação do complexo fosfomolibdênio a fração acetato de etila de *P. alopecuroides* obteve atividade mais expressiva em relação às demais amostras testadas desta espécie com 36,4% de atividade em relação ao padrão vitamina C. Os resultados das demais amostras não foram representativos. Já na amostra fração acetato de etila de *P. lorentzii* pode-se observar atividade equiparada ao padrão vitamina C;
- As frações acetato de etila de ambas espécies também apresentaram maior atividade antioxidante no ensaio de redução do radical DPPH em relação às demais amostras testadas no ensaio. As atividades consideradas são estatisticamente iguais ao padrão rutina e ligeiramente inferior ao padrão vitamina C;

- No ensaio da atividade antioxidante de reação ao ácido tiobarbitúrico foram observados atividades estatisticamente expressivas dos extratos brutos de *P. lorentzii* e de *P. alopecuroides*;
- Na avaliação da eficácia dos extratos, frações e cumarina isolada de *P. lorentzii* e *P. alopecuroides* no desenvolvimento e na eclodibilidade de ovos de nematoides pode se observar melhor atividade nas fração clorofórmica com as menores EC_{50} sendo que a fração clorofórmio de *P. alopecuroides* foi de 17,1 $\mu\text{g/mL}$ e de *P. lorentzii* foi de 9,40 $\mu\text{g/mL}$.
- A EC_{50} de 3,2 $\mu\text{g/mL}$ observada da cumarina isolada 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina é superior àquela vista nas frações clorofórmio das duas espécies em estudo. Atividade esta que justifica a eficácia das frações clorofórmio apresentadas;
- No teste de migração de larvas de nematoides observou-se que as amostras testadas de *P. lorentzii* têm maior eficácia do que as amostras de *P. alopecuroides*, principalmente nas amostras fração clorofórmio: EC_{50} 64,7 $\mu\text{g/mL}$ para FCPI e 104,1 $\mu\text{g/mL}$ para FCPa.
- Já no TMLA a EC_{50} de apenas 3,1 $\mu\text{g/mL}$ da cumarina isolada 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenedioxycumarina justifica mais uma vez a eficácia da fração clorofórmio neste ensaio.
- Considerando os resultados obtidos, pode-se afirmar que os objetivos propostos para este trabalho foram atingidos com êxito.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa por novas moléculas bioativas tem priorizado os aspectos ambientais inseridas num contexto agroecológico buscando o manejo sustentável dos recursos naturais. Associado a isso estão a preservação das espécies vegetais em seus ecossistemas e a produção animal. A fitoterapia pode ser uma das alternativas mais prósperas no controle das parasitoses gastrintestinais, visto que inúmeras são as espécies vegetais usadas na medicina tradicional pelas suas propriedades anti-helmínticas. Entretanto, a eficácia de cada espécie precisa ser validada cientificamente para permitir o uso seguro e adequado de cada espécie para que seja considerada mais uma alternativa no controle das parasitoses (COSTA *et al.*, 2002; NERY, DUARTE e MARTINS, 2009).

O desenvolvimento dos ensaios biológicos neste trabalho permitiu a avaliação do potencial biológico presente nas espécies *Pterocaulon lorentzii* Malme e *Pterocaulon alopecuroides* DC. A atividade antioxidante observada nestas duas espécies ratifica os dados já relatados por outros autores para o gênero *Pterocaulon* e sugere o emprego destas espécies na pesquisa farmacológica associando seu potencial antioxidante a quadros infecciosos e ou anti-inflamatórios.

As propriedades antiparasitárias demonstradas nos ensaios propostos neste trabalho avança para a exploração do gênero *Pterocaulon* e de ambas espécies aqui estudadas para o uso como anti-helmíntico. Entretanto os resultados aqui obtidos são o primeiro passo de uma caminhada para a validação da espécie como planta medicinal assim como o seu uso para a produção de fitoterápicos.

A continuidade desta pesquisa torna-se interessante aos olhos da agropecuária e da indústria farmacêutica por se tratar de espécies nativas da região sul do Brasil onde a produção de ovinos representa crescente porcentagem na economia e é acometida pela resistência a medicamentos anti-helmínticos.

REFERÊNCIAS

- ACHI, Y. L.; ZINSSTAG, J.; YAO, K.; YEO, N.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 151–158. 2003.
- ADELMANN, J. **Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- AKHTAR, M.S.; IQBAL, Z.; KHAN, M.N.; LATEEF, M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. **Small Ruminant Research**, n.38, p.99–107, 2000.
- ALARCÓN, R.; FLORES, R.C.; OCAMPOS, S., LUCATTI, A., GALLEGUILLO, L.F., TONN. C.; SOSA, V. Flavonoids from *Pterocaulon alopecuroides* with antibacterial activity. **Planta Medica** v.74, p.1463–1467, 2008.
- ALARCÓN, R.; PACCIARONI, A.; PEÑALOZA, L.; URIBURU, M.L.; BOEMO, A.; SOSA, V. Phenolic compounds from *Pterocaulon alopecuroides*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, p.1059–1064, 2010.
- ANDERBERG, A. Phylogeny and reclassification of tribe Inuleae (Asteraceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p. 2277-2296, 1989.
- ARBOS, K. A. **Estudo do Potencial Antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos**. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. **Food Chemistry**, v. 74, p. 423-427, 2001.
- ATHANASIADOU, S.; GITHIORI, J.; KYRIAZAKIS, I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. **Animal**, v.1, n.9, p. 1392-1400, 2007.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. **Proceedings of the Nutrition Society**, n.63, p.631–639, 2004.
- BATISTA, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S. Atividade ovicida e larvicida in vitro das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal**, v. 9, p. 67-73, 1999.

BEILLEROT, A.; DOMÍNGUEZ, J.C.R.; KIRSCH, G.; BAGREL, D., Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters** n. 18, p. 1102-1105, 2008.

BEVILACQUA, A.H.V.; SUFFREDINI, I.B.; BERNARDI, M.M. Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), em *Artemia* sp: comparação da preparação comercial e do óleo puro. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, n.26, v. 2, p. 157-160, 2008.

BHARDWAJ, P.; VARSHNEYA, C.; MITTRA, S., Anthelmintic efficacy of *Bauhinia variegata* and *Tagetes patula* against *Haemonchus contortus*. **The Indian Veterinary Journal**, n. 87, p. 1204-1206, 2010.

BIANCO, E.M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpiaceae**. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BIZIMENYERA, E. S.; GITHIORI, J. B.; ELOFF, J. N.; SWAN, G. E. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology** v. 142, p. 336-343, 2006.

BOHLMANN, F.; ABRAHAM, W.R.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Thiophene acetylenes and flavonols from *Pterocaulon virgatum* (Compositae). **Phytochemistry** n. 20, p. 825-827, 1981.

BOTURA, M.B.; DOS SANTOS, J.D.G.; DA SILVA, G.D.; DE LIMA, H.G.; DE OLIVEIRA, J.V.A.; DE ALMEIDA, M.A.O.; BATATINHA, M.J.M.; BRANCO, A. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary Parasitology**, n. 192, p. 211-217, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAVO B, J.A.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ T, A.; MUÑOZ O, V.; CALLAPA, J.; LE MEN-OLIVIER, L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C., Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearenses*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 71-74, 1999.

CABRERA, A.L. Flora de la provincia de Buenos Aires. Buenos Aires: I.N.T.A., v.6, 1963.

CABRERA, A. L. *In*: BURKART, A. **Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina)**. Buenos Aires: I.N.T.A., v.6, n.6, p. 106-554, 1974.

CABRERA, A. L.; RAGONESE, A.M. **Revision del género *Pterocaulon* (Compositae)**. Darwiniana. n. 21, p. 185-257, 1978.

CABRERA, A. L.; FREIRE, S. **Flora Del Paraguay – Compositae**. V. Genebra, n. 27, p. 58-84, 1998.

CÁCERES A, LÓPEZ B, GONZÁLEZ S, BERGER I, TADA I, MAKI J.. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 195–202, 1998.

CARVALHO, J. L. de S. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1031-1035, 2009.

CHAGAS, A.C.S.; VIEIRA, L.S.; FREITAS, A.R.; ARAÚJO, M.R.A.; ARAÚJO-FILHO, J.A. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, v.151, p.68–73, 2008.

CHAN-BACAB MJ, BALANZA E, DEHARO E, MUÑOZ V, GARCÍA RD, PEÑA-RODRÍGUEZ LM. Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 243-247, 2003.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H.J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 72. p. 185-189, 2000.

CLIMENI, B.S.O; MONTEIRO, M.V.; CICOTI, C.A. Hemoncose Ovina. **Revista Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, 2008.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.

COLES, G.C. Sustainable use of anthelmintics in grazing animals. **The Veterinary Record**, n. 151, v. 6, 165–169, 2002.

COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.E.; PRICHARD, R.K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology** n. 3-4v. 136, p. 167-185, 2006.

COSTA, C.T.C.; MORAIS, S.M. DE; BEVILAQUA, C.M.L.; SOUZA, M.M.C. DE & LEITE, F.K.A. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.11, n.2, p.57-60, 2002.

DE JESÚS GABINO, A.F.; MENDOZA DE GIVES, P.; SALINAS SÁNCHEZ, D.O.; LÓPEZ ARELLANO, M. E.; LIÉBANO HERNÁNDEZ, E.; HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ, V.M.; VALLADARES CISNEROS, G. Anthelmintic effects of *Prosopis laevigata* n-hexanic extract against *Haemonchus contortus* in artificially infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Journal of Helminthology**, n. 84, p.71-75, 2010.

DE LUCA NETO, M. Ecto e Endoparasitas em Ovinos. Disponível em: <<http://www.iepec.com/noticia/ecto-e-endoparasitas-em-ovinos>> Acesso em 18/08/2013.

DE MORAIS, S.M., CATUNDA JÚNIOR, F.E.A., DA SILVA, A.R.A., MARTINS NETO, J.S. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**. v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

D'ASSONVILLE, J.A., JANOVSKY, E., VERSTER, A. In vitro screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 73-80, 1996.

DATSU KALIP, R.; SLYRANDA BALTINI, A.; WYCLIFF, A.; ABDULRAHAMAN, F.I., Preliminary phytochemical screening and in vitro anthelmintic effects of aqueous extracts of *Salvadora persica* and *Terminalia avicennoides* against strongyline nematodes of small ruminants in Nigeria. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. n. 10, p.437-442, 2011.

DEBENEDETTI, S.L.; FERRARO, G.E.; COUSSIO, J.D. Coumarins from *Pterocaulon virgatum*. **Planta medica**. v. 42, p.97-98, 1981.

DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; GOMEZ, M. A.; COUSSIO, J. D. Polyphenols Isolated from *Pterocaulon purpurascens*, I. 6-Hydroxyflavonoids. **Journal of Natural Products**, v.50, n.3, p.512–513, 1987.

DEBENEDETTI, S. L., NADINIC, E. L.; GOMES, M. A.; COUSSIO, J. D.; DE KIMPE, N.; BOEYKENS, M. Purpurasol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. **Phytochemistry**. v. 31, p. 3284-3285, 1992.

DEBENEDETTI, S. L., PALACIOS, P. S.; WILSON, E. G.; COUSSIO, J. D. Polyphenols of *Pterocaulon polystachium*. **Fitoterapia**, v. LXV. n.2, 1994.

DEBENEDETTI, S. L., DE KIMPE, N., BOEYKENS, M., COUSSIO, J.D., KESTELEYN, B. Structural revision of four coumarins from pterocaulon species. **Phytochemistry** v. 45, p. 1515-1517, 1997.

DEMELE, J.; VAN ZEVEEREN, A.M.J; KLEINSCHMIDT, N.; VERCRYUSSER, J.; HÖGLUND, J.; KOOPMANN, R.; CABARET, J.; CLAEREBOU, E.; ARESKOG, M.; VOM SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. **Veterinary Parasitology**, v.160, p. 109-115, 2009.

DEMELE, J.; KÜTTLER, U.; EL-ABDELLATI, K.; RYDZIK, A.; STAFFORD, K.; VARADY, M.; KENYON, F.; COLES, G.; HÖGLUND, J.; JACKSON, F.; VERCRYUSSER, J.; VOM SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.174, p. 58-64, 2010.

DEMELE, J.; GILL, J.H.; VOM SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, N.C. The in vitro assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v.3, p. 109-118, 2013.

EGUALE, T.; MIRUTSE, G., In vitro anthelmintic activity of three medicinal plants against *Haemonchus contortus*. **International Journal of Green Pharmacy**, n. 3, p. 29-34, 2009.

FAJIMI, A.K.; TAIWO, A.A. Herbal remedies in animal parasitic diseases in Nigeria: a review. **African Journal of Biotechnology**, n.4, p.303–307, 2005.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1956.

AGUILAR, H.H.; DE GIVES, P.M. ; SÁNCHEZ, D.O.; ARELLANO, M.E.; HERNÁNDEZ, E.L.; AROCHE, U.L., VALLADARES-CISNEROS, G. In vitro nematocidal activity of plant extracts of the Mexican flora against *Haemonchus contortus* fourth larval stage. **Annals of the New York Academy of Science**, n. 1149, p.158-160, 2008.

GEARY, T. G., SANGSTER, N. C.; THOMPSON, D. P.. Frontiers in anthelmintic pharmacology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 275-295, 1999.

GENOVESE, M. I.; SILVA M. P.; DE SOUZA, A. E. S. G.; LAJOLO, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology**, v.14, p. 207-214, 2008.

GITHIORI J.B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, n.139, p.308–320, 2006.

GIRÃO, E.S.; GIRÃO, R.N.; MEDEIROS, L.P. **Verminose em ovinos e seu controle**. Teresina: Embrapa Meio-Norte - CPAMN, 1998.

GIRÃO, E. S.; CARVALHO, J. H.; LOPES, A. S.; MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N. **Avaliação de plantas medicinais com efeito anti-helmíntico para caprinos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte. 1998.

GUARRERA, P.M. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, n.68, P.183–192, 1999.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n. 1-2, p. 7-20, 1995.

HEEMANN, A. C. W. ; MIGUEL, O. G. ; MIGUEL, M. D. ; SASAKI, C. M. ; MONACHE, F. D. . Estudo fitoquímico da espécie *Pterocaulon interruptum*. **RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 585-588, 2006.

HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M.P.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F., La importância de las plantas medicinales. In. _____. **Manual de estratégias para el aislamiento de productos naturales bioactivos**. 1ª ed. Bogotá: Cyted, 2008. p. 13-23.

HOZANGBE-ADOTE, M.S., PAOLINI, V., FOURASTE, I., MOUTAIROU, K., HOSTE, H. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research on Veterinary Science**, n.78, p. 155–160, 2005.

HUANG, D.; OU B.; PRIOR, R. I. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.1981-1986, 2005.

HUBERT, J., KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **The Veterinary Record**, n.130, p.442–446, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). PPM 2010: **Rebanho bovino nacional cresce 2,1% e chega a 209,5 milhões de cabeças**. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2002>> Acesso em 18/08/2013.

INTERNATIONAL INSTITUTE OF RURAL RECONSTRUCTION. Ethnoveterinary medicine in Asia: an information kit on traditional animal health care practices. **International Institute of Rural Reconstruction (IIRR)**, 2ª ed. Silang, Philippines, 1994.

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; ASHRAF, M.; JABBAR, A., Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 93, p.265-268, 2004.

KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Protection of coumarins against linoleic acidhydroperoxide-induced cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 142, p. 239-254, 2003.

KANG, S.Y.; LEE, K.Y.; SUNG, S.H.; PARK, M.J.; KIM, Y.C.; Coumarins Isolated from *Angelica gigas* Inhibit Acetylcholinesterase: Structure-Activity Relationships, **Journal of Natural Products**, n. 64, p. 683-685, 2001.

KRUEGER, R.; DOVER, E.K.; MCSORLEY, R.; WANG, K-H., Marigold (*Tagetes* spp) for nematode management. **University of Florida IFAS Extension**, Publication ENY- 056, 2009.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; RUANGRUNGSI, N.; WATANABE, T.; ISHIKAWA, T. Chemical Constituents of *Pterocaulon redolens*. **Heterocycles** v.61, 183-187, 2003.

Krueger, R., Dover, E.K., McSorley, R., Wang, K-H. **Marigold (*Tagetes* spp) for nematode management**. Florida: University of Florida IFAS Extension, 2009.

KRYCHAK-FURTADO, S. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. 147p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LANS, C.; TURNER, N.; KHAN, T.; BRAUER, G. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, p. 325–340, 2007.

LIMA, L. F. P., **Gênero *Pterocaulon* Ell. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul: Aspectos taxonômicos, palinológicos e fitoquímicos**. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LIMA, L. F. P.; MATZENBACHER, N. I. O gênero *Pterocaulon* Ell. (Asteraceae – plucheeae) no estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 63, n. 2, p. 213-229, 2008.

LÓPEZ AROCHE, U.; SALINAS SÁNCHEZ, D.O.; MENDOZA DE GIVES, P.; LÓPEZ ARELLANO, M. E.; LIÉBANO HERNÁNDEZ, E.; VALLADARES CISNEROS, G.; ARIAS ATAIDE, D.M.; HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ, V., In vitro nematicidal effect of medicinal plants from the Sierra de Huautla Biosphere Reserve, Morelos, Mexico against *Haemonchus contortus* infective larvae. **Journal of Helminthology**, n. 82, p. 25-31, 2008.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, v. 75, p. 197-202, 2001.

MABBERLEY, D.J. **The Plant Book – A Portable Dictionary of the Higher Plants**. Cambridge University, p. 486, Londres: 1987.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Jr.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVERRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACLEOD, J.K.; RASMUSSEN, H.B. A hydroxy-beta-caryophyllene from *Pterocaulon serrulatum*. **Phytochemistry**, v.50, p.105-108,1999.

MACRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143-72, 1988.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**. v. 613, p. 1-19, 2008.

MALME, G.O. Am Die Compositae der zweitem Regnellschen Reise. **Arkiv for Botanik**. n. 6, p. 1-16, 1931.

MARIE-MAGDELEINE, C.; HOSTE, H.; MAHIEU, M.; VARO, H.; ARCHIMEDE, H. In vitro effects of Cucurbita moschata seed extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, n. 161, p. 99-105, 2009.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. "Bendh-Top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A.R. (Ed.) **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., p. 383-409, 1991.

MELO, A. C.; BEVILAQUA, C. M. Abordagem genética da resistência antihelmíntica em *Haemonchus contortus* **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. n. 100 v. 555-556, p. 141-146, 2005.

MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, MCLAUGHLIN JL. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, p. 31, 1982.

MICHAEL, A.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. **Science**, v. 123, p. 464, 1956.

MOLENTO, M.B., PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 21, p. 117-121, 2001.

MOLENTO, M. B.; NICIURA, S. C. M.; CHAGAS, A. C. de S. **Protocolos básicos de laboratório para a realização de metodologias fenotípicas e genotípicas**. In: CHAGAS, A. C. de S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. (Ed.). Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistências e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 117-143, 2011.

MOLYNEUX, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidante. **Songklanakarin Journal of Science and Technology** . v.26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONGELLI, E., PAMPURO, S., COUSSIO, J., SALOMON, H., CICCIA, G., Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. **Journal of Ethnopharmacology** n. 71, p.145–151, 2000.

MONTAGNER, C. **Atividade Antifúngica e Citotóxica de Cumarinas Naturais e Semisintéticas. Florianópolis**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MORAIS, S.M.; CATUNDA JÚNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A; MARTINS NETO, J.S. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v.29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, F.D.P.M., COUTINHO, V., MONTANHER, A.B.P., CARO, M.S.B., BRIGHENTE, I.M.C., PIZZOLATTI, M.G., MONACHE, F.D. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, p. 309-311, 2003.

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of própolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 109-114, 2000.

MURAD, W.; AHMAD, A.; GILANI, S.A.; KHAN, M.A., Indigenous knowledge and folk use of medicinal plants by the tribal communities of Hazar Nao Forest, Malakand District, North Pakistan. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.7, p.1072-1086, 2011.

NERY, P.S.; DUARTE, E.R.; MARTINS, E.R. Eficácia de plantas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.3, p.330-338, 2009.

NG, T. B.; LIU, F.; WANG, Z. T. Antioxidative Activity of Natural Products from Plants. **Life Sciences**, v. 66, p. 709-723, 2000.

NUNDKUMAR, N.; OJEWOLE, J.A.O. Studies on the antiplasmodial properties of some South African medicinal plants used as antimalarial remedies in Zulu folk medicine. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, n.24, p.397–401, 2002.

OJALA, T., VUORELA, P., KIVIRANTA, J., VUORELA, H., HILTUNEN, R. A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. **Planta medica**, v. 65, p. 715-8, 1999.

OKETCH-RABAH, H. A.; MWANGI, J.W.; LISGARTEN, J.; MBERU, E.K.A new antiplasmodial coumarin from *Toddalia asiatica* roots. **Fitoterapia**, v. 71, p. 636-640, 2000.

OLIVEIRA, V.M.A.; CARNEIRO, A.L.B.; CAUPER, G.S.B.; POHLIT, A.M. *In vitro* screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta Amazônica**, v. 39, n.4, p.973-980, 2009.

ONYIAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, p. 203–211, 2005.

PIMENTA, L.P.S., PINTO, G.B., TAKAHASHI, J.A., E SILVA, L.G.F., BOAVENTURA, M.A.D. Biological screening of Annonaceous brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v. 10, p. 209–212, 2003.

PINHEIRO, R. R., GOUVEIA, A. M. G., ALVES, F. S. F. HADDAD, J. P. A. Aspectos zoo-sanitários da caprinocultura cearense. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, p. 534-543, 2000.

PINTO, A.C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

POWERS, K.G.; WOOD, I.B.; ECKERT, J.; GIBSON, T.; SMITH, H.J. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology**, v.10, n.4, p. 265-284, 1982.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. **Horticulture Science**, v. 35, n. 4, p. 588-592, 2000.

QADIR, S.; DIXIT, K.A.; DIXIT, P., Use of medicinal plants to control *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. **Veterinary World**, n. 3, p. 515-518, 2010.

RABEL, B., MCGREGOR, R., DOUCH, P.G.C., Improved bioassay for stimulation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. **International Journal of Parasitology**, n.24, p.671–676, 1994.

RAHMANN, G.; SEIP, H. Bioactive forage and phytotherapy to cure and control endo-parasite diseases in sheep and goat farming systems – a review of current scientific knowledge. **Landbauforschung Völkenrode**, n. 3, v. 57, p. 285-295, 2008.

RAMBO, B.A. Análise geográfica da compostas sul-brasileiras. **Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues**, v. 4, n. 4, p. 87-160, 1952.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Drogas que Inibem a Cholinesterase**. 4^a edição, Guanabara Koogan, p. 110-115, 2001.

ROBERTS, F.H.S., O'SULLIVAN, J.P., Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agriculture Research**. n.1, p. 99-102, 1950.

RÓDIO, C., DA ROCHA VIANNA, D., KOWALSKI, K.P., PANATIERI, L.F., VON POSER, G., ROTT, M.B., In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research**. n. 104, p.191–194, 2008.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

RUPPRECHT, J.K.; HUI, Y.H.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 237-278, 1990.

SÁNCHEZ-MORENO, C; LARRAURI J. A., SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANTA ROSA, J. **Enfermidades em Caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle** – Embrapa Caprinos- Brasília – SPI/ Sobral: Embrapa – CNPC. p.101- 105,1996.

SASAKI, C. M., **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas e antimicrobianas das partes aeras de *Pterocaulon lorentzii* Malme (ASTERACEAE)**. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SCHEUERLE, M.C.; MAHLING, M.; PFISTER, K. Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in small ruminants in Switzerland and Southern Germany. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 121, n. 3, p. 46-49, 2009.

SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T.M.; ROMANHA, A.J.; SHIN, Y.G.; CORDELL, G.A.; ZANI, C.L. New Bioactive Coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 634-637, 2003.

SEELINGER, U. Coastal foredunes of southern Brazil: physiography, habitats and vegetation. *In*: SEELINGER, U. **Coastal Plant Communities of Latin America**. San Diego: Academic Press, p. 367-381, 1992.

SEMPLE, S. J.; REYNOLDS, G. D.; O'LEARY, M.C.; FLOWER, R. L. P. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60 p. a63-a72, 1998.

SEMPLE, S. J., NOBBS, S. F.; PYKE, S. M.; REYNOLDS, G. D. FLOWER, R. L. P. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian Aboriginal medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68 p. 283-288, 1999.

SIQUEIRA, J.M.D. ZIMINIZNI, M.G., RESENDE, U.M., BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, p. 185-187, 2001.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BAROOS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30n. 2 p. 351-355, 2007.

STEIN, A. C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; POSER, G. L. V.. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, , v. 99, p. 211-214, 2005.

STEIN, A.C. ; ÁLVARES, S. ; AVANCINI, C. ; ZACCHINO, S.; POSER, G.L. V. . Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**. V. 107, p. 95-98, 2006.

STEIN, A.C.; FRITZ, D.; PAIVA LIMA, L.F.; MATZENBACHER, N.I.; SCHRIPEMA, J.; PIRES, V.; SONNET, P.; VON POSER, G. Distribution of coumarins in the tribe Plecheeae, Genus *Pterocaulon*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 6, p. 691-693, 2007.

STEFANELLO, M. E. A. **Avaliação estatística de plantas medicinais: química, farmacologia e sistemática**. Tese de Doutorado (Química) – Setor de Ciências Exatas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1993.

THOMAZ-SOCCOL V. Controle da verminose no rebanho ovino. **Revista dos Criadores**, São Paulo, v. 263, p. 1-8, 1996.

THUONG, P. T.; NA, M.; SU, M.D.; SEONG, R.S.; LEE, Y.M.; SOK, D.E.; BAE, K., Inhibitory effect of Coumarins from *Weigela subsessilis* on low density lipoprotein oxidation. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p. 1095-1097, 2005.

TRIPATHI, R. P.; TRIPATHI, R.; BHADURI, A.P.; SINGH, S.N.; CHATTERJEE, R.K.; MURTHY, P.K., Antifilarial activity of some 2H-1-benzopyran-2-ones (coumarins). **Acta Tropica**, v. 76, p. 101-106, 2000.

TYAGI, Y. K.; KUMAR, A.; RAJ, H.G.; VOHRA, P.; GUPTA, G.; KUMARI, R.; KUMAR, P.; GUPTA, R., Synthesis of noval amino and acetyl amino-4-methyl coumarins and evaluation of their antioxidant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 413-420, 2005.

UENO, H.; GUTIERRES, V. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1983.

URQUAHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, p. 9-273, 1996.

VAN VOORHIS, W. C.; BARRETT, L.K.; EASTMAN, R.T.; ALFONSO, R.; DUPUIS, K. Trypanossoma cruzi Inactivation in Human Platelet Concentrates and Plasma by a Psoralen (Amotosalen HCl) and Long-Wavelength UV. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 475-479, 2003.

VERA, N.; BARDÓN, A.; CATALAN, C.A.N.; GEDRIS, T.E.; HERZ, W., New coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. **Planta Medica**, n. 67, p. 674–677, 2001.

VILEGAS, W.; BORALLE, N.; CABRERA, A.; BERNARDI, A.C.; POZETTI, G.L.; ARANTES, S.F. Coumarins and flavonoid from *Ptgerocaulon alopecuroides*. **Phytochemistry**, v.38, n.4, p.1017-1019, 1995.

WAGLAND, B.M., JONES, W.O., HRIBAR, L., BENDIXSEN, T., EMERY, D.L., A new simplified assay for larval migration inhibition. **International Journal of Parasitology**. n.22, p.183–1185, 1992.

WANG, C.J.; HSIEH, Y.J.; CHU, C.Y.; LIN, Y.L.; TSENG, T.H. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. **Cancer Letters**, v. 183, p. 163-168, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Determination of Haemolytic activity, IN: **Quality control methods for medicinal plants material**. Inglaterra, p. 41-43, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Traditional Medicine – Growing Needs and Potential. **WHO Policy Perspectives on Medicines**, Suíça, v2, p.1-6, 2002.

YADAV, N.; VASUDEVA, N.; SING, S.; SHARMA, K.S., Medicinal properties of genus *Chenopodium* Linn. **Natural Product Radiance**, n. 6, p. 131-134, 2007.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 16-44, 2001.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Editora UNIVALI, p. 10-33, 2009.

ZHANG, H.; WANG, L. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v.673, p. 199-202, 2004.

GLOSSÁRIO

Abomaso – ou estômago verdadeiro, é a quarta porção do estômago dos animais ruminantes em que ocorre a digestão propriamente dita. Esta estrutura leva ao início do intestino delgado.

Carga parasitária – Número de vermes carreado por um indivíduo.

Emenagogo – propriedade de algumas substâncias de estimular ou aumentar o fluxo menstrual.

Morbidade – estado de doença.

Mortalidade – Mortes per capita numa população. A taxa de mortalidade é a recíproca da expectativa de vida de uma população.

Náuplio – é o estágio larvar, típico da maioria dos crustáceos aquáticos.

Nematoide – são vermes que possuem o corpo em formato cilíndrico, geralmente alongado e com as extremidades afiladas. Pertencem ao filo Nematoda.

Quimiotaxonomia - classificação de plantas de acordo com a sua composição química.

Resistência - Redução, devido a seleção genética, da susceptibilidade de um parasita ou seu vetor à quimioterapia.

Susceptibilidade – acessibilidade ou capacidade de ser infectado.

Xilopódio – tuberosidade presente nas plantas entre o caule e as raízes, característico de plantas do cerrado em que se acumula água.

ANEXOS

ANEXO 1 -	TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFPR.....	111
ANEXO 2 -	PROTOCOLO DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE...	112

ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFPR



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 061/2011, referente ao projeto “Estudo comparativo das atividades biológicas de *Pterocaulon interruptum* DC e *Pterocaulon lorentizii* Malme (ASTERACEAE)”, sob a responsabilidade de Cristina Mayumi Sasaki Miyazaki, na forma que foi apresentado (utilizando 04 animais), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 20 de dezembro de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 061/2011, regarding the project “Comparative study of the biological activities of *Pterocaulon interruptum* DC and *Pterocaulon lorentizii* Malme (ASTERACEAE)”, in charge of Cristina Mayumi Sasaki Miyazaki, in the terms it was presented (using 04 animals), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on December 2011.



Curitiba, 20 de dezembro de 2011.

Geraldo Camilo Alberton
Presidente

Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

ANEXO 2 - PROTOCOLO DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE

<div style="text-align: center;">  INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GERAL </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> Cassandr 015120002530 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> 13/09/2012 15:03 DEPR </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">  </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> BR 10 2012 023110 7 </div> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;"> Espaço reservado ao protocolo </div>	<div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> < Uso exclusivo do INPI > </div> <div style="text-align: center; height: 80px;"> Espaço para etiqueta </div>
--	---

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal do Paraná
- 1.2 Qualificação: Autarquia Federal
- 1.3 CNPJ/CPF: 75095679/0001-49
- 1.4 Endereço Completo: Rua XV de Novembro, 695 Curitiba/PR
- 1.5 CEP: 80020-310 1.6 Telefone: 41 3310-2699 1.7 Fax: 41 3310-2760
- 1.8 E-mail: inovacao@ufpr.br

☐ continua em folha anexa

- 2. Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

 PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ORIGINÁRIOS DA ESPÉCIE
 Pterocaulon lorentzii Malme, ASTERACEAE.

☐ continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido nº _____ Data de Depósito: _____

- 5. Prioridade:** ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):
☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: Obdulio Gomes Miguel
- 6.2 Qualificação: Doutor 6.3 CPF: _____
- 6.4 Endereço completo: Rua Eduardo Sprada, 4373, Campo Comprido, Curitiba-PR
- 6.5 CEP: 81270-010 6.6 Telefone: 41 3232-0118 6.7 Fax: 41 9163-0617
- 6.8 E-Mail: obdulio@ufpr.br

☒ continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
☐ Listagem de sequências em formato impresso: fls.
☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	2 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	21 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	2 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	1 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) DOU e anexo 1.01				5 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 32 fls.

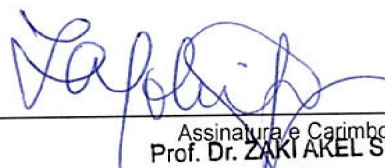
13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Curitiba

13 / 09

/2012

Local e Data


Assinatura e Carimbo
Prof. Dr. ZAKI AKEL SOBRINHO
Reitor

ANEXO DE CONTINUAÇÃO – FORMULÁRIO 1.01

1. Inventor (1):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Fernanda Colombi Cansian

Qualificação: Farmacêutica Bioquímica, Mestre em Ciências Farmacêuticas

Endereço: Rua Treze de maio, 636, apto 603, Bairro Amizade Jaraguá do Sul

CEP: 89.255-400

Telefone: (47) 33715657

E-mail: fecolombi@hotmail.com

1. Inventor (2):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Cristina Mayumi Sasaki Miyazaki

Qualificação: Farmacêutica Industrial, Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Endereço: Rua José Fiori, nº 7 – Pilarzinho, Curitiba, Paraná, Brasil.

CEP: 82.120 - 010

Telefone: (41) 8855-8695

E-mail: miyazaki.cms@gmail.com

1. Inventor (3):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Marilis Dallarmi Miguel

Qualificação: Professora Doutora

Endereço: Eduardo Sprada, 4373, Campo Comprido, Curitiba, Paraná

CEP: 81.270-010

Telefone: 3232-0118 / 9116-5023

E-mail: dallarmi@ufpr.br

1. Inventor (4):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Marcelo Beltrão Molento

Qualificação: Professor Doutor

Endereço: Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, Curitiba-PR

CEP: 80035-050

Telefone: (41) 3350-5618

E-mail: molento@ufpr.br

1. Inventor (5):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Beatriz Cristina Konopatzki Hirota

Qualificação: Mestre em Ciências Farmacêuticas

Endereço: Rua David Carneiro, 305, apto 21, São Francisco, Curitiba, Paraná.

CEP: 80. 530-070.

Telefone: 3308-5725

E-mail: beatriz_konopatzki@hotmail.com

1. Inventor (6):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Fernando Strande Kloster

Qualificação: Médico Veterinário, Especialista

Endereço: Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, Curitiba-PR

CEP: 80035-050

Telefone: (41) 3350-5618

E-mail: fernando.fpb@hotmail.com

1. Inventor (7):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Andressa Salvadori Schafer

Qualificação: Médica Veterinária

Endereço: Dr. Bozano, 711 apto 401, Centro, Santa Maria-RS

CEP: 9715-001

Telefone: (55) 9994 9003

E-mail: andressasalvadori@hotmail.com

1. Inventor (8):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Úrsula Yaeko Yoshitani

Qualificação: Agrônoma, Bióloga, Especialista em Biotecnologia e Bionegócios

Endereço: Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, Curitiba-PR

CEP: 80035-050

Telefone: (41) 3350-5618

E-mail: ursula.yoshitani@ufpr.br

1. Inventor (9):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Fernanda Silva Fortes

Qualificação: Médica Veterinária, Mestre em Ciências Veterinárias

Endereço: Av. senador Souza Naves, 1450, Apto 203 Bloco B, Cristo Rei

CEP: 80050-152

Telefone: (41) 3203-0168 (41) 9132-9912

E-mail: fortesfs@gmail.com

1. Inventor (10):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Andréia Buzatti

Qualificação: Médica Veterinária, mestranda em Ciências Veterinárias

Endereço: Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, Curitiba-PR

CEP: 80035-050

Telefone: (41) 3350-5618

E-mail: deiabuzatti@gmail.com

1. Inventor (11):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Cristina Peitz de Lima

Qualificação: Farmacêutica Industrial, Mestre em Ciências farmacêuticas –UFPR

Endereço: Rua São Gonçalo Amarante 34, Jardim Fátima Colombo, PR

CEP: 83405-740

Telefone: 41 36210771

E-mail: cristinapeitz@hotmail.com

1. Inventor (12):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Cristiane da Silva Paula

Qualificação: Mestre

Endereço: Rua Cândido Xavier 1426 ap 47-B Vila Izabel - Curitiba Pr

CEP: 80.320-220

Telefone: 41-32423636 / 99834277

E-mail: crisspaula@onda.com.br

1. Inventor (13):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Maria Christina dos Santos Verdam

Qualificação: Mestre

Endereço: Rua José Lins do Rego, 168 sobrado 07 - Bairro Alto, Curitiba, Paraná.

CEP: 82820230

Telefone: 41 98140548

E-mail: . christinaverdam@hotmail.com

1. Inventor (14):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Cristiane Bezerra da Silva

Qualificação: Mestre

Endereço: Av. Prefeito Lothário Meissner, 632

CEP: 80210-170

Telefone: (41) 3360-4070.

E-mail: cris.mpj@gmail.com
